

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Importancia pronóstica, predictiva de respuesta y terapéutica de las
fosfatasa MKP-1 y PP2A en el cáncer de mama humano**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Raúl Rincón Sánchez

Directores

Juan Madoz Gúrpide

Federico Rojo Todo

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

IMPORTANCIA PRONÓSTICA, PREDICTIVA DE RESPUESTA Y TERAPÉUTICA DE LAS FOSFATASAS MKP-1 Y PP2A EN EL CÁNCER DE MAMA HUMANO

Raúl Rincón Sánchez

Directores:

Juan Madoz Gúrpide

Federico Rojo Todo

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



IMPORTANCIA PRONÓSTICA, PREDICTIVA DE RESPUESTA Y TERAPÉUTICA DE LAS FOSFATASAS MKP-1 Y PP2A EN EL CÁNCER DE MAMA HUMANO

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

Raúl Rincón Sánchez

Licenciado en Biología,

para aspirar al grado de Doctor por la

Universidad Complutense de Madrid

Directores de Tesis:

Dr. Juan Madoz Gúrpide

Dr. Federico Rojo Todo

Instituto de Investigación Sanitaria - Fundación Jiménez Díaz

Área de Cáncer, Departamento de Anatomía Patológica

Dr. Juan Madoz Gúrpide, investigador adjunto del Área de Cáncer, Departamento de Anatomía Patológica (IIS-FJD) y **Dr. Federico Rojo Todo**, investigador principal del Área de Cáncer, Departamento de Anatomía Patológica (IIS-FJD)

CERTIFICAN:

Que **Raúl Rincón Sánchez**, Licenciado en Biología, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado: **“IMPORTANCIA PRONÓSTICA, PREDICTIVA DE RESPUESTA Y TERAPÉUTICA DE LAS FOSFATASAS MKP-1 Y PP2A EN EL CÁNCER DE MAMA HUMANO”** en el IIS-Fundación Jiménez Díaz.

Revisado el presente trabajo, estiman que se corresponde fielmente a los resultados obtenidos y quedan conformes con su presentación para ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman el presente en Madrid, a treinta de junio de dos mil quince.

Dr. Juan Madoz Gúrpide

Dr. Federico Rojo Todo

Esta Tesis doctoral ha sido realizada en el Área de Cáncer, Departamento de Anatomía Patológica del IIS-Fundación Jiménez Díaz, dirigida por los doctores Juan Madoz Gúrpide y Federico Rojo Todo.

Los estudios de esta Tesis doctoral han sido posibles gracias al apoyo de las siguientes Instituciones Académicas: Instituto de Salud Carlos III (PS09/01296) y Fundación Mutua Madrileña (9757/002).

“La ilusión de que algún día puedes acertar es la perversidad que te hace seguir adelante”

Philip Roth

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a muchas personas que me han rodeado y apoyado durante estos años, tanto en el ámbito profesional como en el personal.

Gracias a mis directores de tesis, Dr. Federico Rojo y Dr. Juan Madoz, por acogerme en vuestro laboratorio, por todo lo aprendido y por muchos buenos momentos con vosotros. Gracias a todo el laboratorio de Patología Molecular (Área de Cáncer; Departamento de Anatomía Patológica) por ser tan buenas compañeras y por tantas cosas acontecidas en estos años. Gracias también al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, por vuestro soporte y facilidades en cuanto al trabajo con las muestras humanas.

Gracias a muchos compañeros y amigos de investigación, de muy diversos laboratorios del IIS-FJD. Especialmente, gracias a mis amigos del Laboratorio de Metabolismo Mineral y Óseo y del Laboratorio de Inmunología 3. Todos estos años han valido la pena en gran parte por vuestra amistad y apoyo diario.

Gracias a mis amigos, tanto los de Madrid, como los de mi época de facultad en Sevilla. Y gracias, por supuesto, a mis amigas de toda la vida (mayoría femenina) de mi querido Campamento y alrededores.

Especialmente le debo esta tesis y la oportunidad de dedicarme a la Ciencia a mi familia, gracias por vuestro absoluto e incondicional apoyo y cariño, sin los cuales no podría haber terminado este trabajo. Especialmente, gracias a mi padre y a mi hermana Irene.

Esta tesis doctoral está dedicada a mi madre y mi abuela Tere, que están en mi corazón; y a mi sobrino Manuel, que es lo más bello de nuestra familia.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	23
RESUMEN	29
SUMMARY	33
INTRODUCCIÓN	41
1.1. Cáncer de mama	43
1.2. Diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama	45
1.2.1. Subtipos histológicos y moleculares del cáncer de mama	45
1.2.2. Pronóstico y predicción clínica y molecular del cáncer de mama	49
1.2.3. Panorama terapéutico del cáncer de mama	52
1.3. Señalización celular en el cáncer de mama	56
1.3.1. Receptores hormonales ER y PR	56
1.3.2. Familia de receptores HER. HER-2	57
1.3.3. Vía de las MAPK	59
1.3.4. Vía PI3K/AKT	60
1.4. Proteínas fosfatasa y cáncer	62
1.4.1. Quinasas y fosfatasa. Importancia en la tumorigénesis	62
1.4.2. Clasificación de las proteínas fosfatasa. Características estructurales y bioquímicas	63
1.4.3. Fosfatasa de MAPK (MKPs). MKP-1	65
1.4.4. Fosfoproteínas fosfatasa (PPPs). PP2A	67
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
MATERIAL Y MÉTODOS	75
3.1. Líneas celulares de cáncer de mama	77
3.2. Modelo murino de cáncer de mama	78
3.3. Muestras de pacientes de cáncer de mama	79
3.4. Ensayos celulares	80
3.4.1. Tratamientos con fármacos y agentes	80

3.4.2. Ensayos de crecimiento celular	81
3.4.3. Ensayo de viabilidad celular	82
3.4.4. Cuantificación de apoptosis	82
3.4.5. Generación de mamíferas	83
3.4.6. Transfección de células	83
3.5. Ensayos moleculares	86
3.5.1. Análisis de perfiles de expresión por arrays	86
3.5.2. Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa	86
3.5.3. Análisis de proteínas por western blotting	87
3.5.4. Inmunohistoquímica	88
3.5.5. Ensayo de actividad fosfatasa de PP2A	89
3.6. Estadística	90
RESULTADOS	93
4.1. Los fármacos docetaxel y doxorubicina modulan la expresión de MAPK y MKP-1 en el cáncer de mama	95
4.1.1. Efectos en la viabilidad celular de docetaxel y doxorubicina en líneas celulares de carcinoma de mama	95
4.1.2. Efectos moleculares de docetaxel y doxorubicina en líneas celulares de carcinoma de mama	97
4.1.3. Sobreexpresión de MKP-1 en líneas celulares de carcinoma de mama	101
4.1.4. Sobreexpresión de MKP-1 y quimiorresistencia a docetaxel y doxorubicina	102
4.1.5. JNK1/2 es el mediador de la quimiorresistencia in vitro a docetaxel y doxorubicina inducida por la sobreexpresión de MKP-1 en el cáncer de mama	107

4.2. Significado clínico de MKP-1 en el cáncer de mama	113
4.2.1. <i>Valor clínico de la expresión de MKP-1 en cáncer de mama precoz tratado en adyuvancia con quimioterapia</i>	113
4.2.2. <i>Valor clínico de la expresión de MKP-1 en cáncer de mama local avanzado tratado en neoadyuvancia con quimioterapia</i>	119
4.3. La activación inducida de PP2A modula la respuesta a doxorubicina en el cáncer de mama	121
4.3.1. <i>Inactivación de PP2A en líneas celulares de carcinoma de mama</i>	121
4.3.2. <i>La activación de PP2A por FTY720 tiene un efecto antitumoral en líneas celulares de carcinoma de mama</i>	124
4.3.3. <i>Efecto celular y molecular de la activación de PP2A en el tratamiento de líneas celulares de carcinoma de mama con doxorubicina</i>	127
4.3.4. <i>Validación in vivo del efecto de la activación de PP2A y el tratamiento con doxorubicina en cáncer de mama</i>	133
4.4. Significado clínico de de PP2A en el cáncer de mama	136
4.4.1. <i>Valor clínico de la activación de PP2A en cáncer de mama precoz tratado en adyuvancia con quimioterapia</i>	136
4.4.2. <i>Valor clínico de la activación de PP2A en cáncer de mama local avanzado tratado en neoadyuvancia con quimioterapia</i>	143
4.4.3. <i>Valor clínico de la activación de PP2A en tratamiento ex vivo de cáncer de mama precoz con doxorubicina</i>	145
DISCUSIÓN	147
5.1. Significado molecular y clínico de la sobreexpresión de MKP-1 en el carcinoma de mama	149
5.2. Significado molecular y clínico de la inhibición de PP2A en el carcinoma de mama	153

5.3. Valor pronóstico y predictivo de las fosfatasas MKP-1 y PP2A en el	
carcinoma de mama humano	157
CONCLUSIONES	165
BIBLIOGRAFÍA	171
ANEXOS	197

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribunucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	adenosín difosfato
AI	inhibidor de aromatasa
AKT	proteína quinasa B
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNsi	ARN pequeño de interferencia
BCA	ácido bicinconínico
CEF	ciclofosfamida-epirubicina-fluorouracilo
CI	índice de combinación
CIP2A	inhibidor cancerígeno de PP2A
CMF	ciclofosfamida-metotrexato-fluorouracilo
CMGC	grupo de proteínas quinasas CDK/MAPK/GSK3/CLK
Ct	ciclo de amplificación de PCR
CTD	dominio carboxilo terminal
DFS	supervivencia libre de enfermedad
DMEM	medio esencial de Dulbecco modificado
DMSO	dimetil sulfóxido
DTT	ditiotreitól
DUSP	proteína fosfatasa de especificidad dual
EDTA	ácido etildiaminotetraacético
EGFP	proteína verde fluorescente aumentada
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
ER	receptor de estrógenos
ErbB2	receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
ERK	quinasa regulada por señal extracelular
FDA	Agencia de Medicamentos y Alimentos
FFPE	tejido fijado en formaldehído y embebido en parafina

FISH	hibridación in situ fluorescente
FTY720	fingolimod
F12	factor de coagulación XII
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
HA	hemaglutinina
HER	receptor del factor de crecimiento epidérmico humano
HER2	receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
IC ₅₀	concentración para el 50% de inhibición
JNK	quinasa c-Jun N-terminal
LMWPTP	proteínas PTP de bajo peso molecular
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
MEK	proteína MAP quinasa quinasa
MKP	proteína fosfatasa de MAP quinasa
MKP-1/DUSP1	proteína fosfatasa de MAP quinasa 1
mTOR	diana de rapamicina en células de mamífero
mTORC1	complejo sensible a rapamicina en células de mamífero
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
NTD	dominio amino terminal
OA	ácido okadaico
OS	supervivencia global
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PAM50	análisis de predicción por array 50
PARP	poli ADP-ribosa polimerasa
PBS	tampón fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pCR	respuesta patológica completa
PIP ₃	fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa
PIK3CA	subunidad catalítica de PI3K

PPM	proteína fosfatasa dependiente de metales
PPP	fosfoproteína fosfatasa
PP2A	fosfoproteína fosfatasa 2A
PP2Ac	subunidad catalítica de PP2A
PR	receptor de progesterona
PSP	proteína serina/treonina fosfatasa
PTEN	fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTP	proteína tirosina fosfatasa
REMARK	Recomendaciones de presentación de informes para estudios de marcadores tumorales pronósticos
Ro-31-8220	inhibidor de la expresión de MKP-1
RQ	cuantificación relativa
SAPK	quinasas activadas por estrés
SDS	dodecilsulfato sódico
SERM	modulador selectivo de ER
SP6000125	inhibidor de la fosforilación de JNK1/2
TBS	tampón tris salino
T-DM1	trastuzumab-emtansina
TNM	tumor, ganglio y metástasis
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
WHO	Organización Mundial de la Salud

RESUMEN

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en los países occidentales. La caracterización biológica de los tumores de mama de acuerdo a patrones de expresión génica mayoritarios estableció una clasificación molecular en diferentes “subtipos biológicos”, que se establecieron como estándar en el diagnóstico del cáncer de mama. Los biomarcadores clave para clasificar los tumores de mama son: el receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR) y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). La terapia principal de erradicación de esta enfermedad es la cirugía del tumor, junto a la quimioterapia adyuvante y/o neoadyuvante. El panorama actual de pronóstico y predicción de la enfermedad y su respuesta a las diferentes terapias (incluyendo terapias personalizadas) es insuficiente, sin embargo, para conseguir la erradicación completa del cáncer de mama. Se precisan, por tanto, nuevos marcadores con valor pronóstico, predictivo y terapéutico.

Las proteínas fosfatasas MKP-1 y PP2A influyen en la señalización celular de las células tumorales de mama lo suficiente como para ser consideradas potenciales biomarcadores de esta enfermedad. Así, analizamos las respuestas de líneas celulares de cáncer de mama a los fármacos docetaxel y doxorubicina en un contexto de sobreexpresión inducida de MKP-1, observando una mayor resistencia de estas células a los tratamientos. Esta sobreexpresión de MKP-1 inhibió la activación de JNK1/2, lo que incrementó la supervivencia celular frente a ambos quimioterápicos. Además, analizamos la proteína PP2A en estas mismas líneas celulares, que se encuentra inhibida por hiperfosforilación y por la expresión de las moléculas reguladoras CIP2A y SET. La activación inducida de la actividad fosfatasa de PP2A mediante el fármaco FTY720 sensibilizó a las células tumorales de mama al tratamiento con doxorubicina. Finalmente, determinamos en biopsias de tumores de mama que la expresión de MKP-1 / p-JNK1/2, por un lado, y p-PP2A / CIP2A, por otro, correlacionaron con peor supervivencia clínica y con peor respuesta de las pacientes a la quimioterapia adyuvante y neoadyuvante.

En consecuencia, nuestro trabajo demuestra el potencial de las fosfatasas MKP-1 y PP2A como marcadores en el diagnóstico clínico y en la previsión de la posible respuesta terapéutica del cáncer de mama.

SUMMARY

Breast cancer is the most common diagnosed cancer and accounts for the majority of cancer-related deaths in European and American women. Clinically, this kind of tumor consists in a very heterogeneous disease that includes a diversity of pathological entities inside a wide clinical progression. Breast is the specific organ where this cancer is developed, which consists in a glandular system made up of lobules that can make milk and thin tubes called ducts that carry the milk from the lobules to the nipple.

Most of breast tumors are adenocarcinomas or tumors composed by tumoral epithelial cells covering lobules and ducts of the breast. First stages of the disease correspond to in situ ductal or lobular carcinoma, being ductal carcinoma the most frequent breast cancer. Stage I and II tumors are usually called early breast carcinomas, while stage III and IV tumors are well known as locally advanced breast carcinomas. The most important risk factors associated with breast cancer include genetic predisposition, exposure to estrogens and ionising radiation, low parity and history of atypical hyperplasia. The diagnosis of breast cancer is based on clinical examination in combination with imaging, and confirmed by pathological assessment according to the WHO classification and the TNM staging system.

Breast tumors quantification by cDNA microarrays performed by Perou CM et al achieved the molecular classification of breast carcinomas based on their gene expression signatures. Since then, the new “molecular portraits” transformed breast cancer diagnosis and were established as fundamental to provide the best prognostic and therapeutic advice. The St Gallen molecular subtype classification of breast carcinomas currently accepted distinguish among these tumor subtypes: luminal A, luminal B HER2-, luminal B HER2+, HER2+ and triple negative tumors.

In order to motivate the progression in therapeutic alternatives with individualized drugs, cancer international committees are promoting the integration between mechanistic cancer research with clinical trials and the implementation of patient’s genetic and biological insights. In this context, the discovery of new biomarkers is essential to elucidate cancer molecular alterations and to classify patients for treatments. The most important biomarkers in breast cancer classification and diagnosis are estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2).

Surgical resection is the principal anti-tumoral therapy in breast cancer. Chemotherapy treatment schedules can be added before (neoadjuvant therapy) or after (adjuvant therapy) the surgery of the primary tumor. In general, locally advanced carcinomas treatments include neoadjuvant chemotherapy, while early breast carcinomas are only treated with adjuvant chemotherapy. Drugs regularly used in breast cancer treatments are alkylating agents (cyclophosphamide), antimetabolites (5-fluorouracil), anthracyclines (doxorubicin) and taxanes (docetaxel). New therapies are focused

in personalized treatments, using latest drugs to target specific molecules. In breast cancer, the most important individualized drugs are: selective estrogen-receptor modulators (tamoxifen), aromatase inhibitors (letrozole) and anti-HER2 antibodies (trastuzumab, lapatinib...).

Despite the progression in breast cancer prognostic and predictive diagnosis and personalized therapy, complete tumor eradication was not reached in an important number of tumors. Thus, new biomarkers to better understand breast cancer signaling and new therapeutic alternatives to improve patient survival are still required.

Tumorigenesis demands protein phosphorylation deregulation to reach all the hallmarks of cancer. Thus, kinases and phosphatases control cellular protein phosphorylation levels. This phosphorylation/dephosphorylation assessment promotes and control several cellular functions, such as proliferation, migration and apoptosis. MKP-1 and PP2A are proved to be involved in breast cancer signaling. Both phosphatases are ubiquitous proteins conserved in evolution and involved in signaling pathways to modulate cell survival. Consequently, MKP-1 and PP2A possess an important potencial as breast cancer biomarkers.

The aims of this work are:

- a) *In vitro* determination of MAPK and MKP-1 modulation in response to chemotherapy (docetaxel and doxorubicin) in breast cancer.
- b) *In vitro* study of MKP-1 overexpression function as chemoresistance factor (docetaxel and doxorubicin) in breast cancer.
- c) Confirmation of MKP-1 predictive value for benefit from chemotherapy (doxorubicin and docetaxel) in breast cancer patients.
- d) *In vitro* characterization of PP2A regulation and activation in different breast cancer subtypes.
- e) *In vitro* and *in vivo* determination of PP2A role as chemoresistance factor (doxorubicin) in breast cancer.
- f) Investigation of PP2A predictive value for benefit from chemotherapy (doxorubicin) in breast cancer patients.

In this work, we firstly analyzed the ability of the chemotherapeutic drugs docetaxel and doxorubicin to regulate MAPK activation, in MDA-MB-231 and BT-474 breast cancer cells. Microarray gene expression quantification of these cells showed MKP-1, MKP-2 and MKP-3 in the

top-25 of down-expressed genes. Further, western blotting analyses revealed MKP-1 inhibition after doxorubicin treatment and a higher phosphorylation status of JNK1/2 and ERK1/2 after docetaxel and doxorubicin treatments, in both breast cancer cells.

To clarify the importance of MKP-1 in docetaxel and doxorubicin effects in breast cancer cells, we transfected MDA-MB-231 and BT-474 with a plasmid construction containing MKP-1 clone cDNA. Gene expression quantification of MKP-1 by Real Time-qPCR and western blotting analysis revealed the overexpression of MKP-1 in both MDA-MB-231 and BT-474. Endogenous MKP-1 protein expression was inhibited by doxorubicin in both cell lines, whereas the ectopic expression of the phosphatase was totally inhibited in BT-474, but not completely in MDA-MB-231 cells. Cell growth quantification by crystal violet staining of these cells overexpressing MKP-1 revealed a considerable defense of breast cancer cells overexpressing MKP-1 against docetaxel and doxorubicin. Besides, cell viability assay by MTS resulted in higher growth values in transfected cells against both drugs. Finally, apoptosis quantification revealed that cells overexpressing MKP-1 reduced the relative amount of apoptotic cells after the chemotherapy treatments.

We next tried to elucidate molecular mechanisms implicated in this improving survival effect after MKP-1 overexpression. Thus, we treated MKP-1-overexpressing cells with anisomycin (JNK1/2 activator), SP6000125 (JNK1/2 inhibitor) and Ro-31-8220 (MKP-1 inhibitor) agents before chemotherapy treatments. Western blotting analysis showed that MKP-1 overexpression effect in both cell lines was higher than these agents' modulation JNK1/2 and MKP-1 modulation. Anisomycin was unable to enforce its effect in the presence of MKP-1-overexpressing cells and the combination between MKP-1 dephosphorylation and JNK1/2 modulation with SP6000125 was the highest JNK1/2 inhibition in transfected cells. However, Ro-31-8220 was unable to inhibit MKP-1 overexpression. Besides, cell growth values resulted in increased viability of transfected cells after docetaxel and doxorubicin treatments, despite of the JNK1/2 modulator included in every condition. Finally, apoptosis analysis showed that MKP-1 overexpression inhibited in part anisomycin induction of apoptosis; and that MKP-1 ectopic expression combined with JNK1/2 inhibition induced by SP6000125 resulted in similar apoptosis inhibition in both breast cancer cells.

In order to validate *in vitro* experiments, we quantified MKP-1 and p-JNK1/2 expression in a cohort of 350 tumors of patients with early breast cancer treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. High MKP-1 levels were quantified in 31% of cases (109/350) and among them, low levels of p-JNK1/2 were found in 80% of cases (87/109). Moreover, the subgroup of patients with MKP-1 overexpression showed a substantially shorter OS ($p < 0,001$) and DFS ($p < 0,001$). Multivariate Cox analysis demonstrated that MKP-1 together with p-JNK1/2 behave as an adverse independent factor associated with OS and DFS in early breast cancer. Finally,

we analyzed MKP-1 and p-JNK1/2 expression in an independent set of 64 patients with locally advanced breast cancer who received neoadjuvant taxane-based chemotherapy. Of importance, we observed that MKP-1 and p-JNK1/2 expression correlates with pathological response ($p = 0,008$).

Trying to further elucidate molecular mechanism of JNK1/2 inhibition by MKP-1, with or without MKP-1 overexpression, western blotting analysis showed high levels of p-PP2A in both MDA-MB-231 and BT-474. We next analyzed p-PP2A, CIP2A and SET protein abundance in five breast cancer cell lines, finding PP2A hyperphosphorylated together with SET and CIP2A markedly overexpressed in all the cell lines. Besides, we quantified PP2A activation status by phosphatase assays in these cell lines, observing that all of them showed a significant reduction of PP2A activity. To confirm their PP2A inhibitory function, CIP2A and SET depletion experiments were carried out in MDA-MB-231 and BT-474 cells, observing that both CIP2A and SET silencing led to an increased PP2A activity

To clarify the biological relevance of PP2A deregulation in breast cancer cells, we treated MDA-MB-231 and BT-474 with the PP2A activator FTY720. Quantification of PP2A activity and cell viability analysis by MTS confirmed that FTY720 led to PP2A activation in both cells. We next assessed apoptosis in this treatment conditions, increasing caspase activity levels more than 5-fold in both MDA-MB-231 and BT-474 cells.

To find out if PP2A specific activation would improve chemotherapy antitumor effects, we treated MDA-MB-231 and BT-474 cells with doxorubicin in combination with FTY720. Cell viability results showed that doxorubicin-induced antitumor effects in breast cancer cells were markedly enhanced when they were treated simultaneously with FTY720. Western blotting analysis proved the inhibition of PP2A phosphorylation and CIP2A expression after FTY720. Besides, p-AKT, p-ERK and c-MYC were also inhibited by this drug. Further, we analyzed the effect of FTY720 treatment in a MDA-MB-231-derived clone with a doxorubicin resistance, observing that FTY720 was able to resensitize to doxorubicin MDA-MB-231 clones with an acquired resistance to this drug. Finally, we evaluated mammosphere formation in BT-474 cells, observing that both FTY720 and doxorubicin decreased mammosphere formation and mammosphere viability, showing a harder eradication with the combination among both drugs.

To validate all these effects *in vivo*, we performed MDA-MB-231 xenografts to evaluate the activity of FTY720 alone or in combination with doxorubicin. Interestingly, FTY720 significantly enhanced doxorubicin-induced antitumor effects. Analysis of tumor specimens collected confirmed that FTY720 led to reduced CIP2A and p-PP2A expression. Besides, all the treatments reduced proliferation and enhanced apoptosis.

In order to translate all these experimental results to clinical biopsies, we quantified SET, CIP2A and p-PP2A expression in a cohort of 230 patients with early breast cancer mainly treated with anthracyclin-based adjuvant chemotherapy. High p-PP2A levels were observed in 20% of cases (46/230), whereas SET and CIP2A were found overexpressed in 13,5% (31/230) and 17,8% of cases (41/230) respectively. Analyzing the PP2A phosphorylation/inhibition status using a “CPscore”, we found that the subgroup of patients with high CPscore showed a substantially shorter OS ($p = 0,006$) and DFS ($p = 0,003$). Moreover, multivariate Cox analysis demonstrated that CPscore is an unfavorable independent factor associated with OS and EFS in early breast cancer. Finally, we analyzed MKP-1 and p-JNK1/2 expression in an independent set of 35 patients with locally advanced breast cancer who received neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy. Interestingly, we observed that PP2A phosphorylation/inhibition negatively correlates with pathological response ($p = 0,009$).

From the results obtained at the present Doctoral Thesis, we resolve that:

1. Docetaxel and doxorubicin *in vitro* inhibit MKP-1 expression and activate ERK1/2 and JNK1/2 in breast cancer.
2. *In vitro* induced MKP-1 overexpression associates with docetaxel and doxorubicin chemoresistance in breast cancer.
3. JNK1/2 is the molecular mediator of docetaxel and doxorubicin chemoresistance induced by MKP-1 in breast cancer.
4. *In vitro* PP2A activity is inhibited in different breast cancer subtypes.
5. PP2A inhibition associates with doxorubicin chemoresistance in breast cancer.
6. *In vitro* and *in vivo* PP2A activation by FTY720 sensitizes to doxorubicin treatment in breast cancer.
7. MKP-1 overexpression and PP2A inhibition in breast cancer associate with worse benefit from adjuvant and neoadjuvant chemotherapy, in terms of overall survival, disease-free survival and pathological complete response.

INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es la enfermedad mas diagnosticada y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en los países occidentales. Los últimos datos epidemiológicos de la Unión Europea han estimado que más de 1.350.000 europeos morirán de cáncer en 2015: el 56% de ese total serán hombres y el 44% mujeres [1]. En el caso del cáncer de mama, la predicción de número de muertes superaría el dato observado en 2009 (90.412 mujeres fallecidas). Variando un poco la tendencia estimada en Estados Unidos, el rango de edad donde las muertes por cáncer de pulmón superarían al cáncer de mama en 2015 sería entre 50 y 79 años, mientras que las muertes por cáncer acontecidas en mujeres mayores de 79 años serían, de nuevo, superadas por el cáncer de mama [1]. Por ello, en las tendencias promedios de todas las edades, las tasas de predicción de muerte por cáncer en 2015 casi se solapan entre cáncer de pulmón y mama (Figura 1).

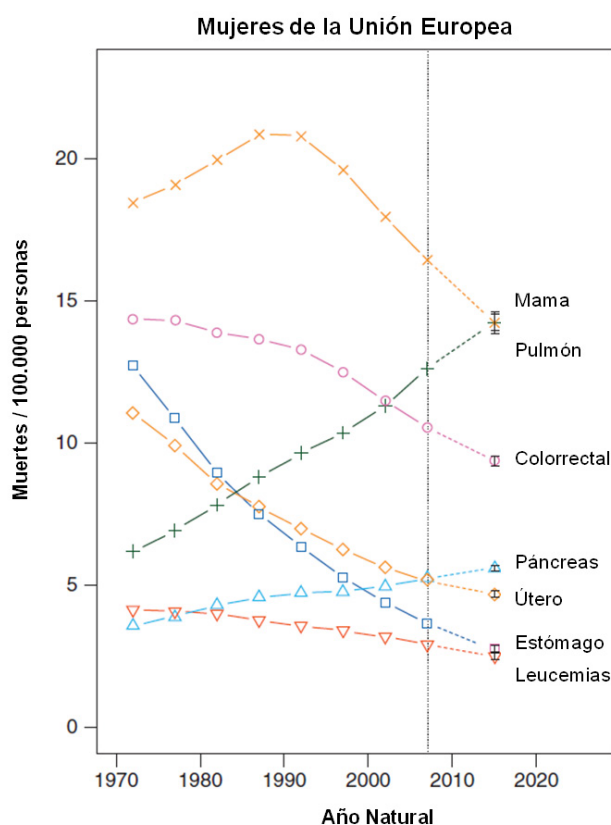


Figura 1. Tendencias de tasa de mortalidad en cáncer en mujeres de la Unión Europea, frente a la población total; y calculadas por períodos de 15 años (desde 1970-1974 hasta 2005-2009); y tasas de predicción para 2015 con 95% de intervalos de predicción (PIs). Tipos de cáncer: estómago (cuadrados), colorrectal (círculos), páncreas (triángulos), pulmón (cruces), mama (equis), útero (diamantes) y leucemias (triángulos invertidos). Adaptado de “Malvezzi M et al, 2015, Ann Oncol”.

En Estados Unidos, la estimación global del cáncer es de más de 1.650.000 nuevos casos, lo que supone más de 4.500 nuevos diagnósticos de cáncer al día. Los tres tipos de cáncer más diagnosticados en mujeres, según esta estimación publicada, serán el cáncer de mama, de pulmón y bronquios, y colorrectal (Figura 2), que acapararían la mitad de los nuevos diagnósticos de cáncer en mujeres en 2015 [2].

En cuanto a las estimaciones de muerte por cáncer, más de 580.000 personas morirán de esta enfermedad en 2015, estando el cáncer de mama entre los tres tipos tumorales que más muertes provocarían (Figura 3). Además, el cáncer de mama se estima como la principal causa

de muerte por cáncer en mujeres entre 20 y 59 años, y la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres mayores de 60 años, donde el cáncer de pulmón sería el primer tipo tumoral en número de muertes [2].

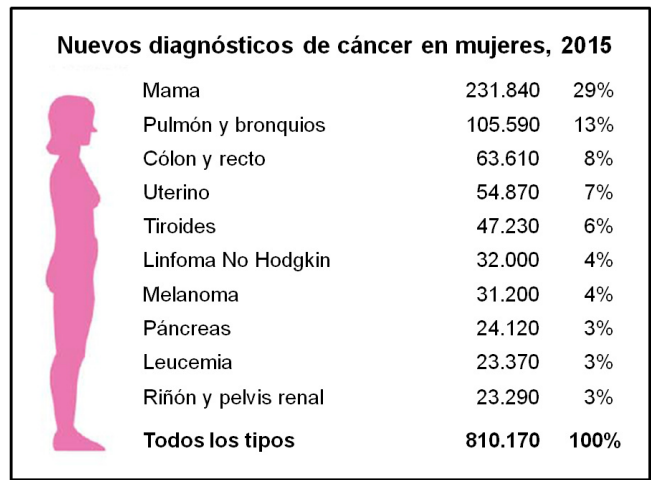


Figura 2. Los 10 tipos de cáncer que lideran la estimación de nuevos diagnósticos de cáncer en Estados Unidos, en 2015. Adaptado de “Siegel RL, Miller KD & Jemal A, 2015, CA Cancer J Clin”.

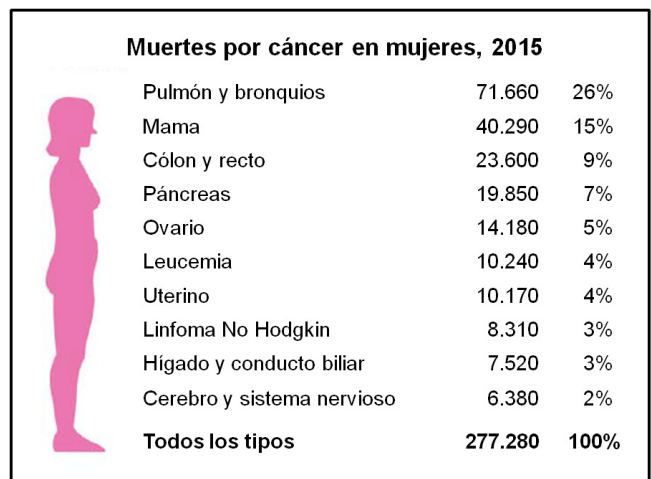


Figura 3. Los 10 tipos de cáncer que lideran la estimación de muertes por cáncer en Estados Unidos, en 2015. Adaptado de “Siegel RL, Miller KD & Jemal A, 2015, CA Cancer J Clin”.

Clínicamente, el cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que comprende una amplia variedad de entidades patológicas en un rango de comportamiento clínico variable. El órgano donde se desarrolla esta enfermedad, la mama o seno, es una glándula constituida por secciones denominadas lóbulos, dentro de las cuales se subdividen en otra entidad denominada lobulillos. Estos lobulillos, durante la lactancia, desembocan en pequeños alveolos o acinos glandulares donde se produce la leche. Toda esta red de lobulillos y lóbulos se encuentra conectada gracias a unos tubos denominados ductos o conductos galactóforos, los cuales canalizan la leche hacia el pezón (Figura 4).

Los factores de riesgo que se consideran más importantes de cara a desarrollar un cáncer de mama son la predisposición genética, la exposición a estrógenos (ya sean endógenos o exógenos), la exposición a la radiación ionizante, la no maternidad y el historial clínico de hiperplasia atípica [3]. Otros factores secundarios serían la dieta alimentaria occidental, la obesidad y el consumo de alcohol [4].

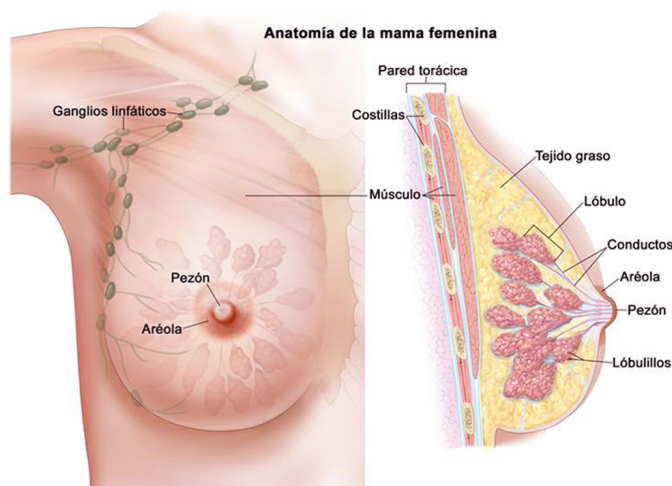


Figura 4. Anatomía de la mama femenina. Como partes exteriores de la mama, se muestran el pezón y la aréola. Como partes interiores de la mama, se muestra la estructura glandular interna (lóbulos, lobulillos, conductos galactóforos) y la pared torácica que la soporta. Adaptado del National Cancer Institute; National Institutes of Health; <http://www.cancer.gov/>.

En resumen, los datos epidemiológicos de incidencia de la enfermedad del cáncer de mama continúan siendo alarmantes, por lo que el progreso en su conocimiento anatómico, molecular y clínico sigue siendo crucial en la lucha contra esta enfermedad.

1.2. Diagnóstico y tratamiento del cáncer de mama

1.2.1. Subtipos histológicos y moleculares del cáncer de mama

La inmensa mayoría de los tumores de mama son adenocarcinomas; es decir, son tumores compuestos de células epiteliales tumorales que revisten los lobulillos o los ductos de la mama. El estadio más inicial del carcinoma de mama es el carcinoma in situ, que puede ser ductal (Figura 5) o lobulillar (Figura 6). Entre ellos, el carcinoma ductal es el más común entre las pacientes con cáncer de mama. Desde este estadio inicial, denominado “estadio 0”, estos carcinomas pueden progresar hasta cualquiera de las formas de los “estadios I, II y III”, correspondientes a los carcinomas invasivos o precoces; e incluso alcanzar la enfermedad metastásica o “estadio IV” [5]. A los carcinomas precoces que, sin alcanzar el estadio IV, presentan especial dificultad de cara a la cirugía, se les denomina carcinomas locales avanzados.

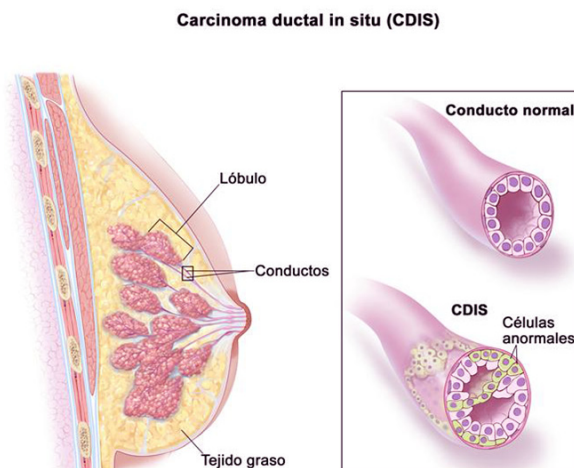


Figura 5. Anatomía de una mama con un carcinoma ductal in situ. Las células transformadas se localizan en el revestimiento de los ductos mamarios. Adaptado del National Cancer Institute; National Institutes of Health; <http://www.cancer.gov/>.

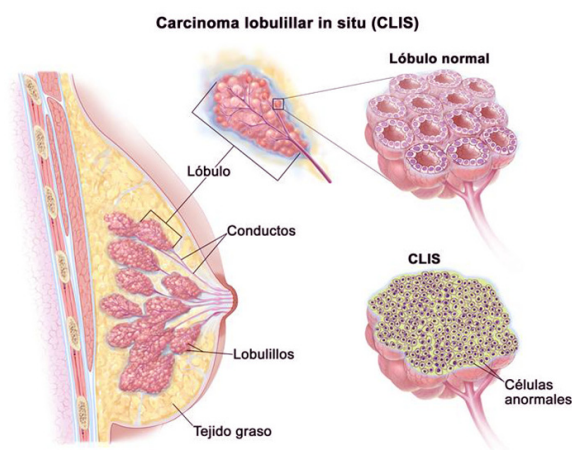


Figura 6. Anatomía de una mama con un carcinoma lobulillar in situ. Las células transformadas se localizan en los lobulillos mamarios. Adaptado del National Cancer Institute; National Institutes of Health; <http://www.cancer.gov/>.

Las pruebas diagnósticas de biopsia directa, de imagen radiológica y del ganglio centinela son fundamentales para determinar en qué estadio de adenocarcinoma de mama se encuentra el tumor de la paciente. En el diagnóstico del cáncer de mama, se combina el reconocimiento clínico con el escaneo y la confirmación que confiere la evaluación patológica (Tabla 1). El diagnóstico patológico se realiza de acuerdo a la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (WHO) [6] y a la escala de clasificación del tumor, ganglio y metástasis (TNM) [3].

Tabla 1. Pruebas diagnósticas para el cáncer de mama. Adaptado de “Senkus E et al, 2013, Ann Oncol”.

Evaluación del estado de salud general	Historia clínica
	Estado de menopausia
	Reconocimiento físico
	Recuento de carga sanguínea
	Test funcional hepático y renal, fosfatasa alcalina y calcio
Evaluación del tumor primario	Reconocimiento físico
	Mamografía
	Ecografía (ultrasonido) de mama
	Resonancia magnética de mama (no recomendada de rutina)
	Biopsia
Evaluación de los ganglios linfáticos	Reconocimiento físico
	Ultrasonido
	Biopsia orientada por ultrasonido (si hay sospecha)
Evaluación de enfermedad metastásica	Reconocimiento físico
	Otros tests sólo recomendados salvo que haya indicios de tumor avanzado o de metástasis

Clásicamente, y en base a parámetros morfológicos casi en exclusiva, se pensaba que la tumorigénesis del cáncer de mama se desarrollaba en un proceso de pasos sucesivos, siguiendo el modelo de Volgenstein previamente descrito para el cáncer colorrectal [7]. Posteriormente, el progreso en el conocimiento inmunohistoquímico y molecular de este tipo de carcinoma conllevó al cambio de esta concepción de tumorigénesis hacia un proceso más complejo de eventos genéticos que podían derivar hacia los diferentes tumores mamarios invasivos por dispares vías tumorigénicas [8-10].

Un hito básico en la determinación de los nuevos “subtipos moleculares” en el cáncer de mama fue el estudio realizado, por plataformas de arrays de ADNc, en los patrones de expresión génica de tejidos de mama humana normales y malignos de 42 individuos. Gracias al uso de métodos de clasificación por jerarquía en grupos de tumores con patrones de expresión génica similar, este estudio liderado por Charles M. Perou identificó 4 grupos de muestras relacionadas con diferentes patrones moleculares de la biología epitelial de la mama: luminal/ER+, basal, Erb-B2+ o HER2+ y mama normal [11]. La importancia de este estudio recayó en la homogeneidad y singularidad que los denominados “retratos moleculares” del cáncer de mama proporcionaron al conocimiento de esta enfermedad. Estudios posteriores del mismo grupo, utilizando cohortes mayores de tumores, confirmaron que el subtipo luminal resultante podía subdividirse en varios tipos con características genéticas y celulares diferentes (Figura 7). Además, esta clasificación de los tumores de mama se validó como marcador pronóstico respecto a la supervivencia de los pacientes, en base a una cohorte terapéutica homogénea [12].

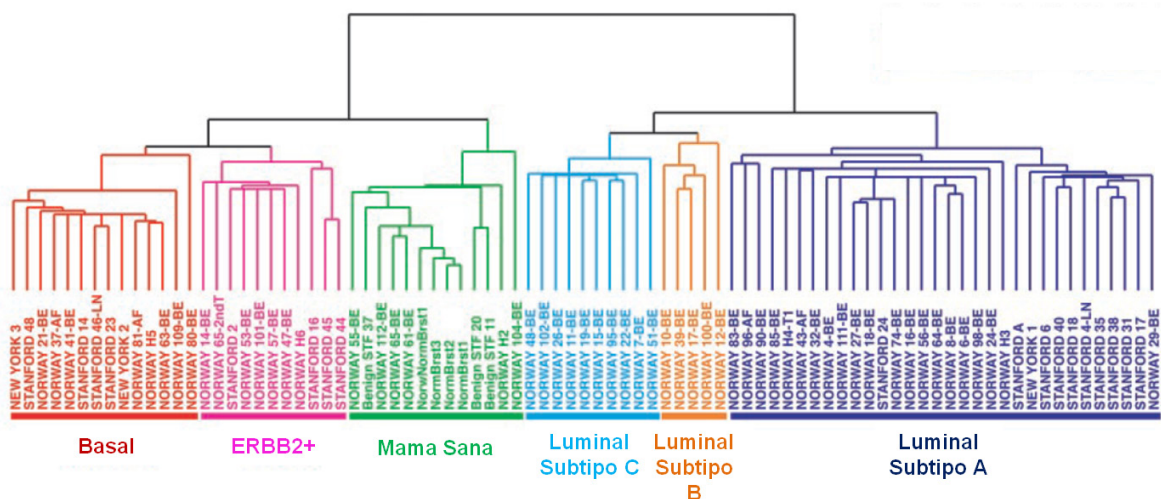


Figura 7. Patrones de expresión de 85 biopsias de mama humana, analizadas por grupos jerárquicos usando un set de clones de 476 ADNc. Las muestras tumorales se dividieron en 6 subtipos en base a las diferencias en la expresión génica. Adaptado de “Sorlie T et al, 2001, PNAS”.

Estos nuevos subtipos tumorales de mama y el concepto revolucionario que supone la clasificación en base a la verdadera biología desde la base genética hasta la celular, fueron definitivamente establecidos como estándar a la hora de diagnosticar, sobre todo en cuanto al pronóstico clínico, el carcinoma de mama [13-16]. De esta forma, se estableció como primordial caracterizar cada tumor de mama dentro del denominado “subtipo intrínseco” o “subtipo biológico” para evaluar su relevancia pronóstica y proporcionar el mejor consejo terapéutico posible [17].

La caracterización biológica del cáncer de mama desde el análisis genético masivo ha constatado la heterogeneidad de esta enfermedad, no sólo a nivel molecular, sino también en cuanto a la sensibilidad a los tratamientos y a la composición celular [18]. Por esta razón, los subtipos moleculares han seguido redefiniéndose, destacando entre ellos el subtipo de cáncer de mama con baja expresión en Claudina [19, 20] y el heterogéneo grupo de “tumores de mama triple negativo”, que incluye diferentes subtipos moleculares y cuyas alternativas terapéuticas están aún por esclarecerse [21, 22]. En paralelo, los avances en la biología del cáncer de mama proporcionaron nuevas bases pero re teorizar sobre la evolución que las células epiteliales deben padecer para poder adquirir la forma de estos “retratos moleculares” a los que llamamos subtipos biológicos [23].

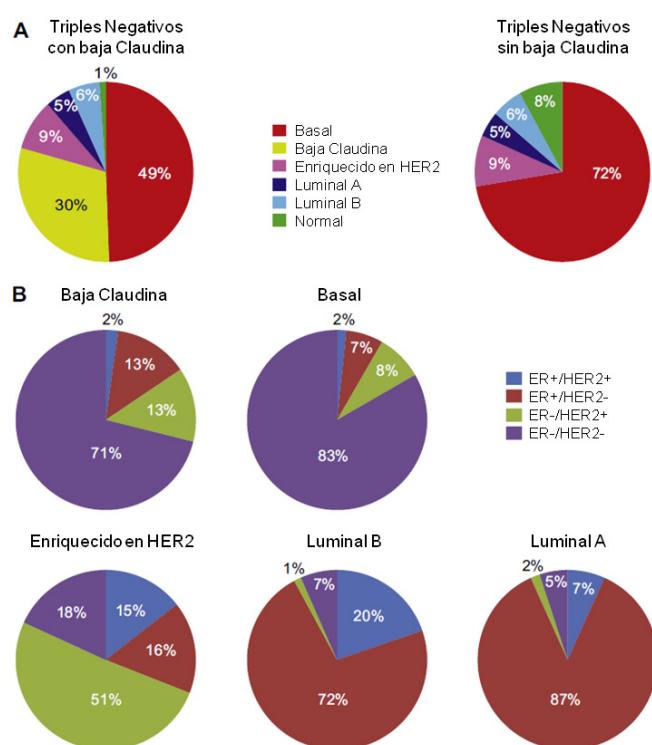


Figura 8. Distribución de las categorías clínico-patológicas de acuerdo a los subtipos intrínsecos de cáncer de mama. A) Distribución de los subtipos intrínsecos dentro de la categoría “triple negativo”, diferenciando entre tumores con baja o alta expresión de Claudina. B) Distribución de grupos de tumores según ER y HER2, en los diferentes subtipos intrínsecos. Adaptado de “Prat A & Perou CM, 2011, Mol Oncol”.

En resumen, podemos afirmar que la clasificación del cáncer de mama, desde el momento en que han entrado en escena las plataformas genéticas de secuenciación masiva, continúa en progreso de cambio por la heterogeneidad molecular que presenta la enfermedad (Figura 8). Las futuras clasificaciones proporcionarán, en consecuencia, mejores herramientas diagnósticas y terapéuticas.

1.2.2. Pronóstico y predicción clínica y molecular del cáncer de mama

La heterogeneidad que representa el cáncer de mama dificulta enormemente la selección de la mejor opción terapéutica en cada paciente. Frente a esta situación y en paralelo al establecimiento de los subtipos biológicos discutidos anteriormente, nuevas líneas de investigación sobre nuevos marcadores que mejoren estas decisiones terapéuticas han progresado notablemente en los últimos años.

El objetivo fundamental a alcanzar tras el diagnóstico del cáncer de mama, al igual que en cualquier tipo de cáncer, es la caracterización molecular, biológica e histológica de los tumores de las pacientes [24]. Con este propósito, diferentes aproximaciones moleculares están en continuo desarrollo: traslación de las alteraciones genéticas y epigenéticas a la clínica oncológica [25]; detección de los patrones de expresión génica, por plataformas de arrays de ADN, de los tumores individualizados [26]; uso diagnóstico de las células tumorales circulantes en plasma [27] y análisis mutacional del mismo [28]; detección de biomarcadores en suero o plasma a través de abordajes proteómicos [29]; y uso de los sistemas de escaneo molecular para la localización de los tumores [30].

Desde que se establecieron los primeros subtipos biológicos de carcinoma mamario [11], los estudios encaminados al progreso en el diagnóstico de la enfermedad y la predicción de respuesta a las terapias tuvieron que adaptarse a esta nueva concepción de la enfermedad como, por encima de todo, entidad molecular cada vez más individualizada.

Tratando de acelerar el ritmo de desarrollo de alternativas terapéuticas con fármacos más individualizados, los comités internacionales de los principales tipos de cáncer promovieron la integración de la investigación básica del cáncer con los ensayos clínicos en los que se incorporasen nuevos conocimientos genéticos y biológicos de los pacientes, de manera que la búsqueda de nuevos biomarcadores no quedase limitada a la investigación del laboratorio básico y pudiese ser trasladada a la clínica de manera más efectiva y funcional [31, 32]. Así, las terapias personalizadas están dirigidas hacia determinados defectos en la señalización celular de un grupo más o menos caracterizado de tumores, dentro de cada tipo de cáncer, donde dichas terapias serán clínicamente efectivas. Tanto los defectos moleculares como los grupos seleccionados de pacientes son caracterizados por la presencia de biomarcadores [33].

Además del clásico biomarcador diagnóstico, que proporciona el valor inicial de la existencia del tumor, existen diferentes tipos de biomarcadores según la información clínica que proporcionan sobre el tumor y su tratamiento (Figura 9). Los biomarcadores pronósticos predicen cómo va a desarrollarse un tumor, diferenciando entre los tumores de “buen seguimiento

clínico” (buen pronóstico) y los de “mal seguimiento clínico” (mal pronóstico). Los biomarcadores predictivos evalúan la probabilidad de que un paciente de cáncer se pueda beneficiar de un tratamiento específico. Finalmente, los biomarcadores terapéuticos o farmacodinámicos cuantifican los efectos tempranos de un tratamiento en el tumor, o la dosis adecuada para el mismo [24].

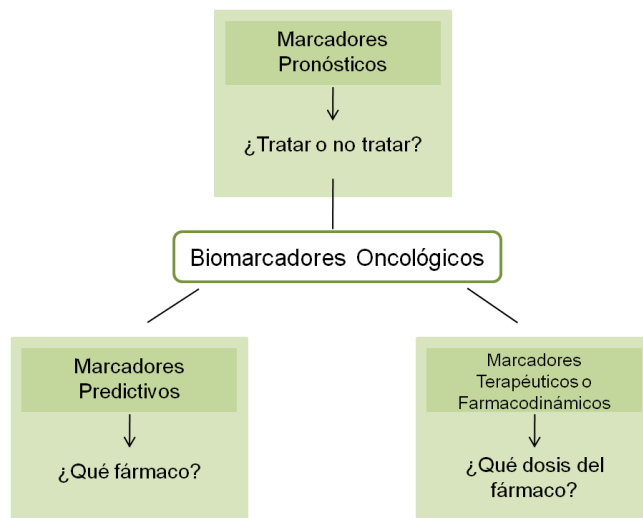


Figura 9. Tipos de biomarcadores oncológicos. Los biomarcadores oncológicos pueden predecir el curso natural del tumor y su seguimiento clínico (pronósticos); también pueden proporcionar información sobre las posibilidades de respuesta de un paciente a un fármaco concreto (predictivos); además, pueden indicar qué dosis del fármaco sería la más efectiva (terapéuticos o farmacodinámicos). Adaptado de “Sawyers CL, 2008, Nature”.

La aprobación de biomarcadores para su uso en el diagnóstico de cada tipo de cáncer requiere de todo un proceso de validación y certificación, tanto de la entidad “biomarcador” en sí como del procedimiento para su detección en clínica, recogido en guías específicas publicadas por la FDA desde 2004. Además, se requiere de la aplicación a cada biomarcador a aprobar de una serie de factores que determinen si dicho biomarcador está listo para ser utilizado en estudios clínicos, entre los que se incluyen pruebas de genotipado, pruebas farmacodinámicas, evidencias experimentales *in vitro* e *in vivo* y pruebas de interacción con agentes antitumorales [33].

Los biomarcadores clave en la clasificación biológica del cáncer de mama, que han progresado desde marcadores patológicos a biomarcadores predictivos, son el receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesterona (PR) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu o HER2).

ER es un receptor hormonal nuclear que se activa por la hormona 17β -estradiol y que, celularmente, funciona como factor de transcripción modulador de una amplia red de genes [34, 35]. Su importancia en el cáncer de mama radica en que más del 60% de los tumores mamarios están compuestos por células tumorales ER+ (es decir, de subtipo luminal); y que cerca del 40% de los mismos no responden a la terapia hormonal específica anti-ER+ [36].

PR es otro receptor nuclear, activado por la hormona progesterona (también conocida como P4), cuya activación es crucial en la proliferación ductal y la diferenciación lobulillar de la glándula mamaria [37]. Su papel en la tumorigénesis de mama está aún por esclarecer, ya que por

un lado su expresión predice respuesta a terapia hormonal junto con ER [38]; pero, posteriormente, se ha comprobado que su baja expresión en tumores de mama ER+ y HER2- empeora el pronóstico clínico de las pacientes [39].

HER2 es un receptor de membrana perteneciente a una familia de receptores tirosina quinasa (HER1-4) que puede ser activada por múltiples ligandos, induciéndose homo o heterodimerizaciones entre ellos y cuya consecuencia es la activación de vías dirigidas hacia la proliferación, la motilidad y la supervivencia celular [40]. Su importancia en el cáncer de mama radica en los negativos datos de pronóstico clínico que se asocian a los tumores con amplificación de HER2, que suponen aproximadamente el 20% de las pacientes de cáncer de mama [41, 42]. En consecuencia, las terapias dirigidas contra este receptor de membrana han tenido una enorme importancia terapéutica en el tratamiento del subtipo HER2+ de cáncer de mama [43].

La proteína nuclear Ki-67 también es un biomarcador predictivo de cáncer de mama [44, 45]. Esta proteína es necesaria para el proceso de proliferación celular, relacionándose con la transcripción del ARNr y localizándose en todas las fases del ciclo celular. Su valor pronóstico en cáncer de mama es independiente, al igual que los biomarcadores anteriores [46], siendo fundamental a la hora de determinar el subtipo intrínseco de cada tumor y, en consecuencia, para el diagnóstico de esta enfermedad (Figura 10).

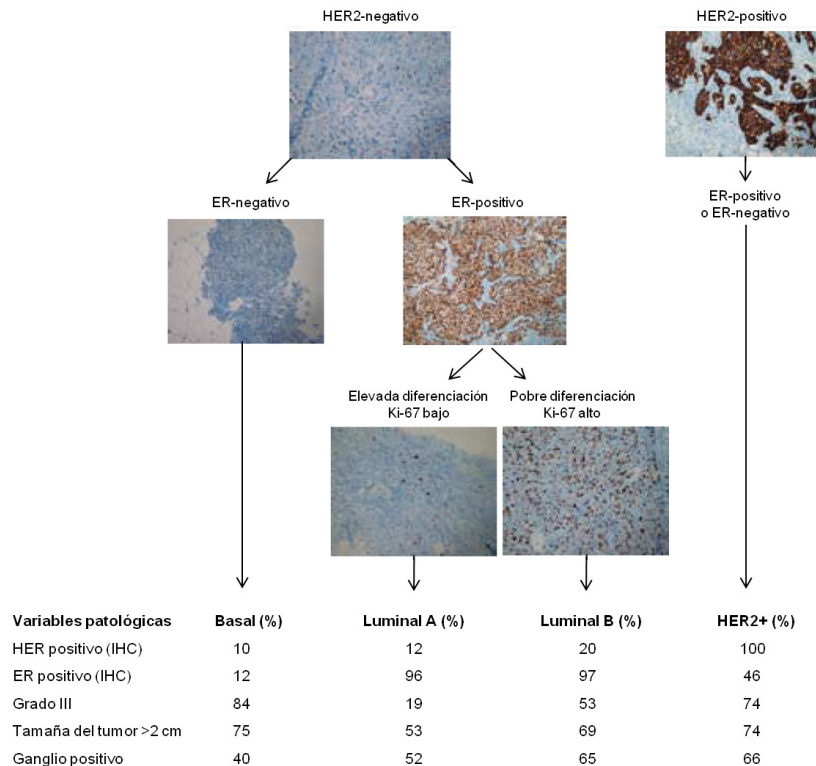


Figura 10. Correspondencia entre subtipo molecular y parámetros clinicopatológicos en cáncer de mama. La determinación de HER2 por inmunohistoquímica (IHC) sólo estuvo disponible en 82 de los 535 pacientes de los estudios combinados en este diagrama. ER: receptor de estrógenos; Ki-67: antígeno nuclear de Ki-67. Adaptado de “Sotiriou C & Pusztai L, 2009, N Engl J Med”.

El desarrollo del uso de plataformas de arrays de ADNc para relacionar patrones de expresión génica con el diagnóstico clínico ha producido una serie de herramientas pronósticas basadas en el análisis de firmas genómicas específicas de los tumores de mama [47]. Investigadores del Instituto Holandés del Cáncer desarrollaron una firma genética de 70 genes, denominada MammaPrint (Agendia), cuya utilidad se ha estandarizado para apoyar el pronóstico de pacientes menores de 61 años, con carcinomas de mama de estadio I o II, negativos para ganglio centinela y con un tamaño tumoral menor de 5 cm [48]. Otro grupo de la Universidad de Pittsburgh creó un marcador de recurrencia de 21 genes, denominado Oncotype Dx (Genomic Health), cuyo uso clínico se ha establecido no sólo como prueba pronóstica, sino especialmente como prueba de predicción del riesgo de recaída en pacientes con tumores ER+, negativos para ganglio centinela, tratados con tamoxifeno, con el objetivo final de identificar a aquellos pacientes con bajo riesgo que no necesitarían quimioterapia [49].

En el año 2009, se publicó una nueva prueba de expresión génica conocida como el “análisis de predicción por array 50” o “PAM50” [15]. Este análisis genómico mide la expresión de 50 genes y proporciona una elevada precisión a la hora de identificar el subtipo intrínseco. Desde ese año, el indicador de subtipo PAM50 ha demostrado un gran valor pronóstico y predictivo a través de múltiples estudios de pacientes con cáncer de mama [50-55].

A la vista de este panorama de biomarcadores existentes en la actualidad para el pronóstico y la predicción del cáncer de mama, podemos afirmar que la capacidad clínica para clasificar estos tumores y decidir la mejor terapia ha avanzado a pasos agigantados en la última década. Sin embargo, el conocimiento molecular del cáncer de mama continúa aumentando y las definiciones de subtipos biológicos han de seguir progresando [56]. Por ello, los avances en la búsqueda de biomarcadores y pruebas moleculares pronósticas y predictivas deben proseguir su camino.

1.2.3. Panorama terapéutico del cáncer de mama

El fin último del progreso en el conocimiento y el diagnóstico de la enfermedad del cáncer de mama es la selección, cada vez más certera y clínicamente exitosa, del mejor esquema terapéutico para erradicar el tumor. Tras el diagnóstico de la paciente, basado como hemos explicado anteriormente tanto en la histopatología como en la biología molecular del tumor de mama [3], los denominados “comités de mama” determinan el esquema de tratamiento a seguir para cada paciente, especialmente en los casos de elevada complejidad biológica y de pronóstico agresivo. Estos comités multidisciplinares suelen estar formados por especialistas de distintas áreas médicas, entre los cuales deberían incluirse cirujanos, oncólogos radioterapeutas, oncólogos médicos, radiólogos y patólogos especializados en cáncer de mama [57].

El tratamiento por cirugía del cáncer de mama precoz es la terapia principal para erradicar este tipo de tumor. La tendencia de los últimos años se ha dirigido hacia la cirugía conservadora de la mama, pero en ocasiones no es posible evitar la mastectomía total de la glándula. En el primer caso, es crucial la cuidadosa evaluación de posibles restos tumorigénicos de los márgenes de resección [58]. Aunque el riesgo de recaída local se relacione con la agresividad biológica de la enfermedad (según el subtipo biológico), no existen evidencias suficientes de que una cirugía ampliada pueda superar este riesgo [59].

Cuando la terapia principal para tratar un tumor de mama es la cirugía, los esquemas de tratamiento por quimioterapia que se añadan al régimen terapéutico pueden incorporarse tras la cirugía para asegurar la eliminación de restos tumorales y aumentar la probabilidad de supervivencia (terapia adyuvante); o antes de la cirugía para reducir la agresividad y complejidad inicial del tumor diagnosticado, de difícil manejo a nivel quirúrgico (terapia neoadyuvante). En general, los carcinomas precoces requieren de terapia neoadyuvante si se diagnostican como localmente avanzados; en caso contrario, sólo se tratarían en adyuvancia tras la cirugía.

La radioterapia es la utilización de radiaciones ionizantes para el tratamiento, local o locorregional, de determinados tumores empleando rayos X de alta energía. En el cáncer de mama, los últimos consensos acordados en la Conferencia Internacional sobre Cáncer de Mama de St Gallen fueron enfocados hacia su uso hipofraccionado en determinados casos [60] y, en la mayoría de los casos, tras la cirugía conservadora [61]. Además, se consideró que la reirradiación en casos de recaída del tumor de mama podría ser una alternativa a la mastectomía de rescate [62].

La quimioterapia consiste en el tratamiento de un tumor con una combinación de fármacos antineoplásicos en un régimen de tratamiento estándar. La diana principal de este tipo de terapia son células de proliferación acelerada, incluyendo tanto células tumorales como otro tipo de células con estas características, como por ejemplo las células de la médula ósea. Los principales tipos de fármacos utilizados en quimioterapia adyuvante o neoadyuvante de cáncer de mama son (Figura 11):

- Agentes alquilantes, que dañan directamente el ADN impidiendo la reproducción de las células cancerosas. Uno de los más utilizados es la ciclofosfamida.
- Antimetabolitos, que interfieren en el crecimiento del ADN y el ARN al sustituir elementos fundamentales de estas biomoléculas. Uno de los más utilizados es el 5-fluorouracilo.
- Antraciclinas, que consisten en antibióticos que alteran las enzimas implicadas en la replicación del ADN. Agentes utilizados de este grupo son la doxorubicina y la epirubicina.

- Taxanos, que son capaces de inhibir la mitosis o las enzimas necesarias para la misma. Agentes utilizados en este grupo son el paclitaxel y el docetaxel.

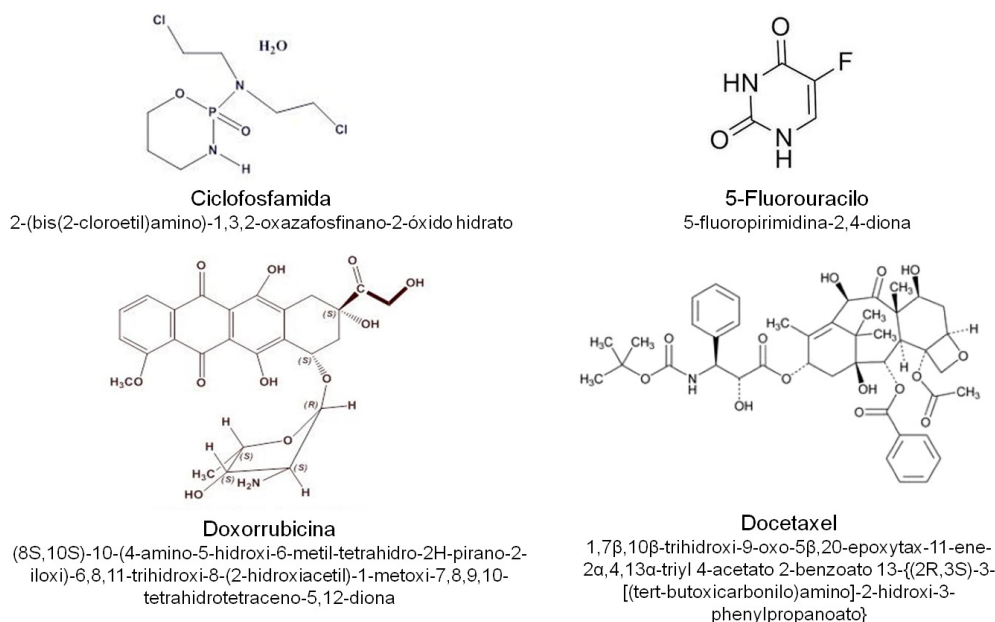


Figura 11. Agentes quimioterápicos utilizados en quimioterapia adyuvante y neoadyuvante de cáncer de mama.

Diferentes estudios han pretendido evaluar la capacidad de la quimioterapia para beneficiar la supervivencia de los diferentes subtipos biológicos de carcinoma de mama. En estudios prospectivos a más de 600 pacientes con cáncer de mama, el valor de recurrencia proporcionado por el ensayo genético “Oncotype Dx” fue capaz de identificar grupos de pacientes que no se beneficiaban de la adición de quimioterapia adyuvante en su régimen terapéutico [63]. Además, la clasificación PAM50 no mostró beneficio significativo en pacientes de subtipo Luminal A o B tratados con quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas (ciclofosfamida-epirubicina-fluorouracilo o CEF) en comparación con el esquema adyuvante ciclofosfamida-metotrexato-fluorouracilo (CMF) [51].

La selección de esquemas de quimioterapia neoadyuvante sigue patrones de decisión clínica similares a los aplicados en el marco adyuvante convencional [64]. El valor de beneficio clínico de este tipo de quimioterapia, proporcionado en el caso del cáncer de mama por la cuantificación de la respuesta patológica completa (pCR) [65], se estudió en comparación con el riesgo de recurrencia calculado a partir de la clasificación PAM50 y se concluyó que la quimioterapia neoadyuvante no era beneficiosa en tumores con riesgo de recurrencia bajo [15].

No sólo a causa del bajo beneficio que, en numerosas ocasiones, la quimioterapia provoca en la supervivencia de las pacientes con cáncer de mama, sino también por los fenómenos de resistencia que las células tumorales de mama han mostrado ante estos agentes en multitud de estudios [66-70]; la investigación de este tipo de cáncer ha progresado hacia la individualización de

la terapia y la búsqueda de alternativas farmacológicas a la quimioterapia. Gracias al establecimiento de los subtipos biológicos dentro del diagnóstico del cáncer de mama, los comités clínicos son capaces, actualmente, de aproximar mejor el esquema terapéutico que cada paciente necesita (Tabla 2), tanto a nivel de la predicción de la respuesta del tumor como a los posibles fenómenos de resistencia [71].

Tabla 2. Subtipos biológicos de cáncer de mama y sus esquemas terapéuticos recomendados (13th Conferencia Internacional St Gallen de Cáncer de Mama). ^aCuantificación del riesgo de recurrencia por firmas genéticas, como por ejemplo el PAM50. Adaptado de “Goldhirsch A et al, 2013, Ann Oncol”.

Subtipo Biológico	Definición clínico-patológica	Tipo de terapia
Luminal A	Luminal A: ER+ PR+ HER2 negative bajo Ki-67 Riesgo de recurrencia bajo ^a	Terapia endocrina (a menudo, en exclusiva)
Luminal B – HER2 negativo	Luminal B (HER2 negativo): ER+, HER2 negative alto Ki-67 o PR- o bajo Riesgo de recurrencia alto ^a	Terapia endocrina para todos los pacientes, quimioterapia para la mayoría
Luminal B – HER2 positivo	Luminal B (HER2 positivo): ER+ HER2 positivo o amplificado Minima expresión de Ki-67 o PR	Quimioterapia + anti-HER2 + terapia endocrina
HER2 positivo	HER2 positivo (no luminal): HER2 sobre-expresado o amplificado Ausencia de ER o PR	Quimioterapia + anti-HER2
Basal	Triple negativo (ductal): Ausencia de ER o PR HER2 negativo	Quimioterapia

La terapia endocrina consiste en el tratamiento de tumores de mama ER+ con dos tipos de fármacos específicos para la inhibición de la activación y funcionamiento de estos receptores nucleares en las células tumorales: los moduladores selectivos de ER (SERMs) y los inhibidores de aromatasa (AIs) [71]. Los SERMs son fármacos que reconocen e inhiben ER y, en consecuencia, la vía de señalización activada por el mismo. Los tres SERMs aprobados por la FDA son tamoxifeno, toremifeno y raloxifeno. Entre ellos, el tamoxifeno es el más utilizado para prevenir la replicación y proliferación celular en todos los estadios del carcinoma de mama. En largos periodos de tiempo tras la finalización del tratamiento, tamoxifeno ha demostrado que impacta positivamente en la reducción de la incidencia en tumores de mama invasivos y ER+ [72-74]. Los AIs son fármacos

capaces de bloquear la síntesis de estrógenos a partir de andrógenos, provocando la reducción de los niveles de estrógenos circulantes en suero, tejidos y células tumorales [71]. El letrozol es un fármaco perteneciente a este grupo y se ha demostrado que podría ser mayor su efecto en pacientes que fuesen premenopáusicas en el momento del diagnóstico, pero postmenopáusicas tras completar su tratamiento con tamoxifeno [75].

La terapia anti-HER2 consiste en el tratamiento de pacientes con tumores HER2+ con agentes cuya diana sea, precisamente, la presencia de esta proteína tirosina quinasa de membrana. Los fármacos más importantes de este grupo de agentes son trastuzumab, lapatinib, pertuzumab y trastuzumab-emtansina (T-DM1), los cuales inhiben HER2 y otros receptores de la familia en las células tumorales con el fin de inhibir el crecimiento tumoral [71]. Trastuzumab fue aprobado para el tratamiento del cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 en monoterapia [76] y se combinó con quimioterapia para mejorar los objetivos de supervivencia clínica demandados por estos tumores de mama especialmente agresivos [77]. Sin embargo, su éxito inicial se vio reducido por los fenómenos de resistencia acontecidos en la clínica, por lo que ha sido necesario profundizar en los eventos moleculares acontecidos en las células tumorales de mama HER2+ [78-81]. En consecuencia, el progreso en la investigación clínica de nuevas opciones para inhibir tanto HER2 como otras formas de receptores HER es fundamental a la hora de mejorar la supervivencia de las pacientes HER2+ [82].

Otro tipo de agentes se encuentran en diferentes fases de investigación, preclínica o de ensayo clínico, para tratar el cáncer de mama tanto en monoterapia como en combinación con otros agentes ya recogidos en las principales guías. Entre ellos, podemos destacar los inhibidores de VEGF [83], PARP [84], PI3K [85] y mTOR [86].

En resumen, podemos afirmar que, aunque el panorama terapéutico del cáncer de mama ha progresado enormemente en los últimos 15 años, los fenómenos de resistencia clínica frente a los agentes disponibles (tanto quimioterápicos como agentes de terapia personalizada) continúan siendo una dificultad a combatir, tanto a nivel de la predicción inicial como de la mejora de los esquemas terapéuticos que erradiquen los diferentes subtipos de carcinoma de mama.

1.3. Señalización celular en el cáncer de mama

1.3.1. Receptores hormonales ER y PR

Los receptores hormonales ER y PR son fundamentales en determinados subtipos moleculares del cáncer de mama y pueden predecir respuestas a terapias individualizadas, como comentamos anteriormente. La unión con las hormonas correspondientes en el citoplasma celular

produce una cascada de eventos que conllevan a la migración al núcleo para, junto con los elementos de respuesta a hormonas, activar la transcripción de determinados genes. Además, se ha visto que ER puede actuar como coactivador de complejos transcripcionales para modular la expresión de otras secuencias de ADN, como la que expresa para la proteína activadora 1 (AP-1) [87]

Además de esta función de promotor de transcripción, ER es capaz de asociarse a la membrana plasmática mediante el anclaje a la caveolina-1, pudiendo formar complejos con proteínas G monoméricas o receptores tirosina quinasa como EGFR [88]. Las consecuencias celulares de estas interacciones suelen ir encaminadas a la activación de vías proliferativas y a la inhibición de la apoptosis, alterando la actividad de numerosas moléculas clave en estas señalizaciones, como ERK1/2, p38, JNK1/2, AKT, c-Src o CDK-7 [89].

La actividad molecular de PR funciona de manera similar a la de ER, pudiendo migrar al núcleo para la activación de la transcripción de genes o interaccionar con proteínas quinasas de la familia c-Src y producir la activación de la vía Ras/RAF/MAPK [90]. Además, se sabe que esta activación de MAPK a través de c-Src ejercida por PR puede producir la regulación de la ciclina D1 y, en consecuencia, la progresión del ciclo celular [91].

De esta forma, se demuestra que los receptores hormonales ER y PR son fundamentales en la biología del cáncer de mama, no sólo por su utilidad como biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta a terapias hormonales, sino por su influencia en la señalización celular de las células tumorales.

1.3.2. Familia de receptores HER. HER2

El receptor HER2, marcador pronóstico y predictivo crucial en el diagnóstico del cáncer de mama, es un receptor tirosina quinasa transmembrana perteneciente a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGFR), también llamada “familia HER” o “familia ErbB” [92]. Los receptores pertenecientes a esta familia están implicados en las intercomunicaciones célula-célula y célula-estroma a través de la transducción de señales activada por factores de crecimiento (ligandos). En último término, esta activación conlleva a la transcripción de una red de genes, actuando como intermediarios proteínas transmembrana y otras biomoléculas de señalización intracelular y sus, en ocasiones, correspondientes actividades enzimáticas [40].

Los cuatro receptores HER comparten una estructura polipeptídica consistente en un dominio extracelular rico en cisteína donde puede reconocer a sus ligandos extracelulares; y un dominio quinasa intracelular carboxilo terminal con sitios activos de autofosforilación por tirosinas tras la dimerización (Figura 12). Mientras que algunos receptores dimerizan tras el reconocimiento de sus ligandos, como en el caso de EGFR/HER1; otros carecen de estos ligandos endógenos, y

pueden formar heterodímeros con otros receptores u homodimerizar de manera espontánea si se encuentran sobreexpresados en la membrana celular, como en el caso de ErbB2/HER2 [93]. Así, la red horizontal de interacciones intramembrana entre los diferentes receptores de esta familia de proteínas es crucial para la modulación de las vías de señalización que controlan [40].

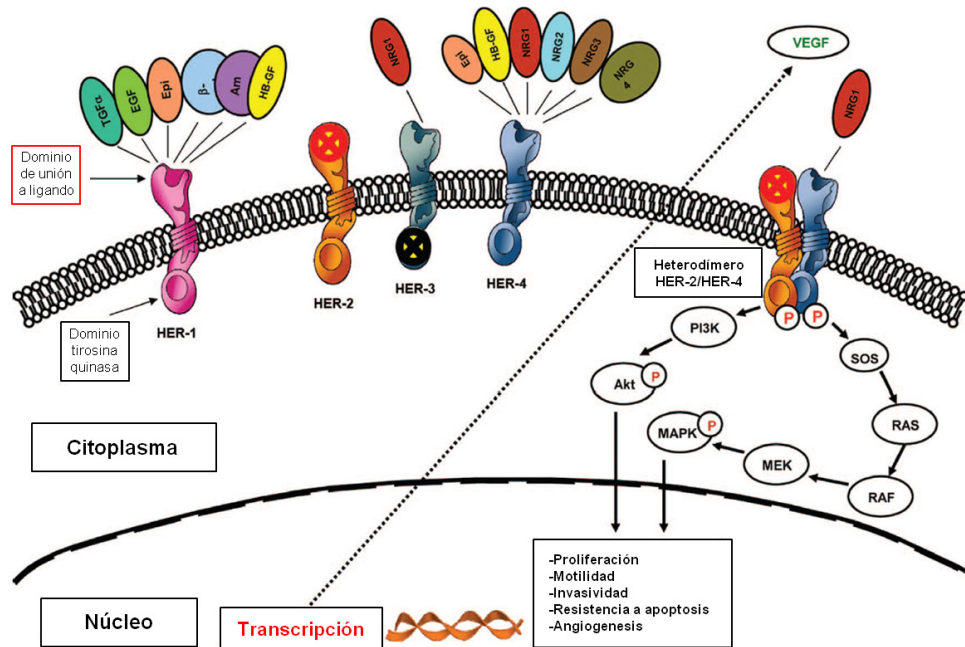


Figura 12. La familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER). Cada uno de los receptores transmembrana, con sus correspondientes ligandos endógenos y las principales vías de señalización y funciones celulares en las que participan como transductores de señales. Adaptado de “Ross JS et al, 2009, Oncologist”.

Tras la dimerización de los receptores HER, una enorme red de proteínas de unión a tirosinas fosforiladas puede ser alterada para activar una enorme variedad de vías de señalización celular, con efectos en funciones celulares tales como la proliferación, la invasividad o la angiogenesis (Figura 12). Los residuos de tirosina autofosforilados del dominio quinasa de cada dímero formado y las proteínas subyacentes a modular en consecuencia son dependientes tanto de los tipos de dímeros a formar, como de los ligandos específicos que desencadenan la transducción de la señal [94]. Las vías de señalización que principalmente median estos receptores son la vía MAPK activada por Ras y la vía PI3K/AKT (Figura 12). En el caso de la vía que parte de PI3K, la potencia y cinética de activación varía según los dímeros a formarse, ya que se ha comprobado que PI3K se acopla directamente con ErbB3 y ErbB4 pero indirectamente con ErbB1 y ErbB2 [95].

En el cáncer de mama, la sobreexpresión de HER2 y su capacidad para promover la tumorigénesis de las células tumorales en este tipo de cáncer motivó numerosos años de investigación farmacológica hasta conseguir el primer anticuerpo monoclonal anti-HER2 aprobado para el tratamiento del carcinoma de mama HER2 positivo, en especial en los tumores metastásicos.

Su efecto se validó como inhibidor de la señalización celular proliferativa de este receptor, así como antiangiogénico, citotóxico y dañino a nivel del ADN celular [96]. Los fenómenos de resistencia clínica a trastuzumab conllevaron a testar otro tipo de inhibiciones de receptores HER, en ocasiones en combinación con este anticuerpo monoclonal [82].

En la terapia combinada de trastuzumab con otros inhibidores de receptores HER, se ha comprobado que tanto la baja expresión de la proteína supresora de tumores PTEN como la mutación protumoral PIK3CA son cruciales a la hora de evaluar la resistencia de los tumores de mama a trastuzumab y el posible beneficio de su combinación con lapatinib [97]. Por ello, vías de señalización tendentes al mantenimiento de la proliferación y la supervivencia celular como la dirigida por PI3K o MAPK son el foco para evaluar la utilidad clínica de estos nuevos fármacos dirigidos contra los receptores de esta familia de proteínas transmembrana.

1.3.3. Vía de las MAPK

La supervivencia de las células tumorales del cáncer de mama, al igual que en otros tipos de cáncer, tiene como protagonista principal al mantenimiento de las funciones proliferativas a través de diferentes vías de señalización. Una de las más importantes es la vía controlada por las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).

Las proteínas MAPK son quinasas serina/treonina, pertenecientes al grupo de proteínas quinasas CMGC (CDK/MAPK/GSK3/CLK) [98], con una amplia expresión en muy diversos tipos celulares y patologías, cuyas funciones determinan la regulación del crecimiento celular y la homeostasis en respuesta a estímulos externos, siendo clave su papel en el cáncer humano [99-101]. Las subfamilias de MAPK más importantes son las quinasas reguladas por señales extracelulares ERK1/2, que responden principalmente a factores de crecimiento y diferenciación; ERK5, que es capaz de responder a factores de crecimiento y a señales de estrés; y las dos subfamilias de quinasas activadas por señales de estrés (SAPK): las quinasas p38 α , - β , - γ y - ϵ , y las quinasas c-Jun N-terminal o JNK1, -2 y -3, que suelen responder a condiciones de estrés, agentes que dañan el ADN y citoquinas [99].

La activación de estas quinasas es consecuencia de la actividad de una cascada compuesta por tres proteínas quinasas que se activan, en orden unidireccional, por sucesivas fosforilaciones (Figura 13) [102]. Entre los receptores de la señal extracelular (EGFR, HER2, citoquinas...) y la cascada de proteínas MAPK, una serie de proteínas G monoméricas (entre las que destaca Ras) son las encargadas de transmitir esa señal hacia la activación de las MAPK y, en consecuencia, la transducción de la señal hacia las funciones celulares requeridas.

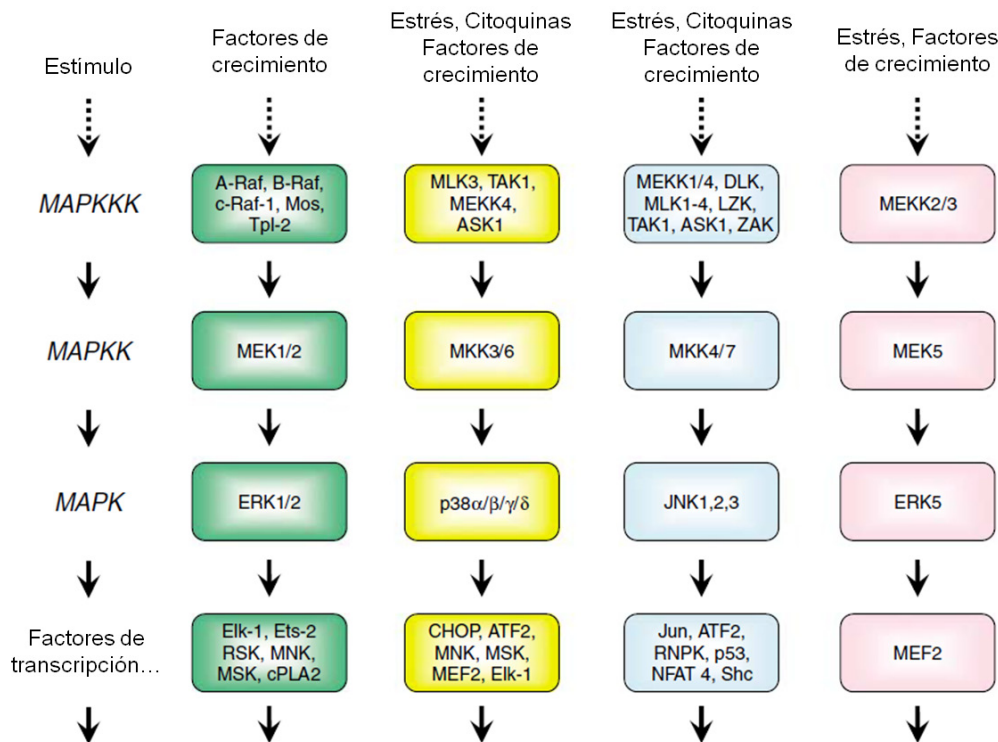


Figura 13. Cascadas de proteínas quinasas MAPK en mamíferos. Adaptado de “Roberts PJ & Der CJ, 2007, Oncogene”.

La importancia de la actividad de la vía Raf/Ras/MEK/ERK en la tumorigénesis de diversos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, ha dado lugar a sucesivos intentos de tratar las células tumorales con terapias dirigidas hacia diferentes escalones de esta vía de señalización [103]. Además, la vía PI3K es capaz de controlar la activación de determinadas vías MAPK como respuesta a las señales de crecimiento celular, por lo que dirigir terapias hacia ambas vías de señalización es fundamental para mejorar las terapias del cáncer de mama [104, 105]. De hecho, se ha demostrado que tumores de mama de subtipos biológicos específicos tienen una sensibilidad especial por inhibidores de la cascada MAPK, lo cual abrió posibilidades a la hora de mejorar los esquemas de tratamientos de los mismos [106]. Finalmente, el estudio molecular de las resistencias a quimioterapia, terapia endocrina y anti-HER2 ha implicado a las MAPK, tanto a su capacidad funcional como a la modulación de la misma en determinados contextos celulares o terapéuticos [107-111].

1.3.4. Vía PI3K/AKT

Otra vía de señalización fundamental en la proliferación y supervivencia de las células tumorales del carcinoma de mama es la vía controlada por la familia de proteínas fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K).

En respuesta a las señales transmitidas por los receptores HER, la enzima PI3K fosforila al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato, pasando a ser fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). Este mensajero lipídico básico en la tumorigénesis es capaz de activar la proteína quinasa B (más conocida como AKT) y otras vías que se dirigen hacia la inhibición de la apoptosis y la promoción del crecimiento celular, la proliferación, la angiogénesis y la acumulación de mutaciones genéticas (Figura 14) [112]. En esta vía de señalización, moléculas esenciales son también el complejo sensible a rapamicina o mTORC1, que promueve la traducción de proteínas una vez activado [113], y la enzima fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa o PTEN, que cataliza la defosforilación contraria a la acción de PI3K, reduciendo la cantidad real de PIP3 y, en último término, las señales de proliferación y protumorigénicas [114].

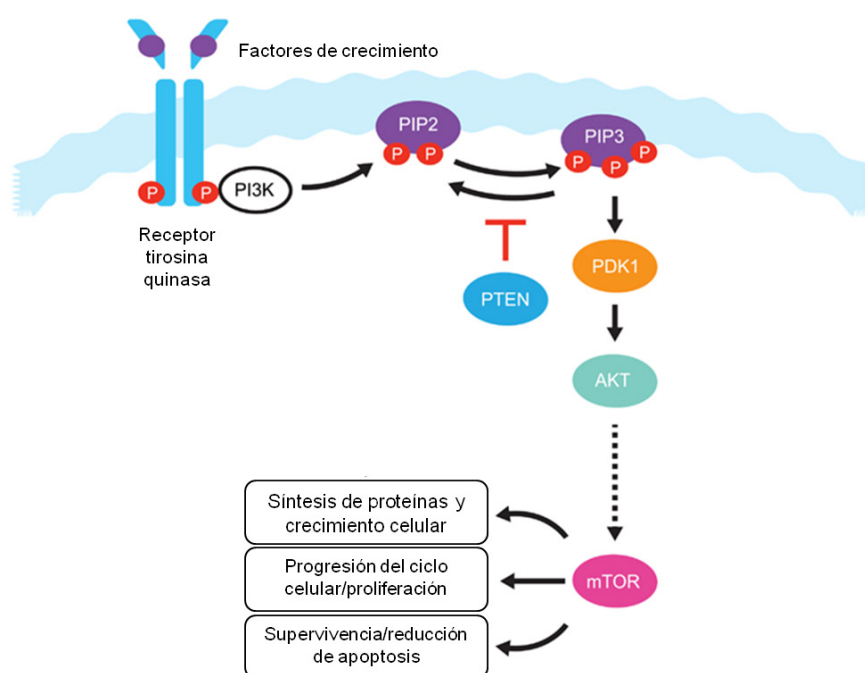


Figura 14. La vía de señalización PI3K/PTEN/AKT. Adaptado de “Phin S, Moore MW & Cotter PD, 2013, Front Oncol”.

En el cáncer de mama se han detectado mutaciones de todo tipo en la ruta PI3K/AKT, como por ejemplo las mutaciones descritas en AKT-1 que incrementan drásticamente su activación [115]. Además, más del 25% de los tumores de mama presentan mutaciones somáticas en la subunidad catalítica de PI3K (PIK3CA), incrementando la capacidad tumorigénica de estos tumores no sólo a través de la vía canónica PI3K/AKT, sino también por vías alternativas [116-118]. Por el contrario, la pérdida de la expresión de PTEN se asocia a numerosos tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama [119], siendo capaz de predecir peor supervivencia de las pacientes con amplificación de HER2 [120]. Finalmente, en los tumores con sobreexpresión de HER2, las mutaciones en PI3K y PTEN han mostrado conexión molecular con la resistencia a trastuzumab,

pero no a lapatinib [121]. Así, se demuestra la importancia de la vía PI3K/AKT en la tumorigénesis de mama, siendo en la actualidad uno de los focos de investigación tanto a nivel molecular como terapéutico.

1.4. Proteínas fosfatasas y cáncer

1.4.1. Quinasas y fosfatasas. Importancia en la tumorigénesis

Como hemos visto en apartados anteriores, las proteínas quinasas efectúan funciones clave en el desarrollo y mantenimiento de las células tumorales. Por esta razón, el progreso en la investigación de estas proteínas en el cáncer de mama y de otros tipos conllevó al desarrollo de un enorme número de inhibidores de quinasas con notable eficacia clínica en estas enfermedades [122]. Con el tiempo y la experiencia en el uso de estos inhibidores quinasas, se ha comprobado que, salvo un pequeño porcentaje de tumores con una clara correlación entre la mutación oncogénica dominante detectada y el desarrollo de la enfermedad, el panorama genético mayoritariamente complejo de los tumores dificulta la selección de dianas efectivas [123].

La fosforilación reversible de proteínas es uno de los más importantes mecanismos de regulación de proteínas, ya presente en los organismos procariotas [124]. La fosforilación reversible supone un cambio conformacional en la estructura de una enorme cantidad de proteínas, produciendo su activación o inhibición funcional. Por ello, el correcto funcionamiento de las proteínas que controlan este cambio post-traducciona (las proteínas quinasas y fosfatasas) son claves a la hora de mantener la actividad celular normal.

La tumorigénesis requiere de la desregulación de la fosforilación de proteínas para alcanzar todas las capacidades propias del cáncer [125]. La complejidad de la expresión y acción de las proteínas quinasas en el cáncer está basada no sólo en el hecho de ser las proteínas más frecuentemente mutadas en los tumores sólidos [126], sino que parecen tener unas funciones moleculares que van más allá de controlar rutas concretas en momentos concretos, abarcando la existencia de amplios y complejos “interactomas” dependientes de proteínas quinasas clave que otorgan propiedades dinámicas de reprogramación molecular frente a los ataques farmacológicos que puedan padecer [127, 128].

En todas estas modulaciones moleculares dirigidas por proteínas quinasas están participando, a su vez, otro grupo de proteínas que realizan la función enzimática inversa: defosforilar. Así, las proteínas quinasas y fosfatasas controlan los niveles de fosforilación de las proteínas de la célula y estos balances de fosforilación/defosforilación promueven con determinación numerosos procesos celulares, como el crecimiento, la migración o la apoptosis [129].

En la tumorigénesis de mama, las proteínas fosfatasa juegan un papel fundamental que puede desarrollarse tanto en forma de gen supresor de tumores como de oncogén [130]. Así, el interés despertado por este grupo de proteínas y su capacidad para modular funciones básicas de la célula tumoral a través del control de la fosforilación de proteínas es objeto de intenso estudio y un posible futuro marco de nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas [131, 132].

1.4.2. Clasificación de las proteínas fosfatasa. Características estructurales y bioquímicas

Las proteínas fosfatasa son proteínas capaces de eliminar grupos fosfato de residuos aminoacídicos fosforilados de otras proteínas. Su papel de función opuesta a la fosforilación de proteínas es crucial en la integración de numerosas vías de señalización celular [133, 134].

Las proteínas fosfatasa comprenden, inicialmente, dos superfamilias distintas: las proteínas tirosina fosfatasa o PTPs y las proteínas serina/treonina fosfatasa o PSPs. La diferencia fundamental entre ellas recae en los residuos aminoacídicos que son capaces de defosforilar.

Las PTPs son enzimas intracelulares y receptores de membrana que defosforilan, mayoritariamente, residuos de tirosina a través de un mecanismo basado en la existencia de un residuo de cisteína en su bucle catalítico, el cual es sensible a la oxidación reversible [135]. Otros tipos de PTPs son capaces de defosforilar residuos de serina y treonina además de tirosina, y otros incluso de carbohidratos o ARNm. Los más de 100 miembros de esta superfamilia pueden subdividirse en 4 grupos en base a las secuencias y funciones que presentan [136]. El grupo mayor lo componen las PTPs de clase I, que presentan la secuencia conservada (H/V)C(X)5R(S/T) en su sitio activo, siendo la cisteína su residuo catalítico en la reacción de defosforilación. Dentro de este grupo, podemos diferenciar entre las PTPs clásicas tirosina-específicas (con 17 fosfatasa citosólicas y 21 fosfatasa receptores transmembrana), y las fosfatasa de especificidad dual serina/treonina o DUSPs (61 proteínas repartidas en varios tipos, entre los que destacan las MKPs y las PTENs). La clase tipo II solo tiene un miembro, la PTP de bajo peso molecular o LMW; y la clase tipo III tiene tres miembros, nombrados como CDC25A-B-C. Ambas clases comparten el hecho de que sólo presentan residuos catalíticos de cisteína. Finalmente, la clase IV tiene 4 miembros con residuos catalíticos de ácido aspártico que tienen la peculiaridad de que requieren de un ión metálico para realizar su actividad enzimática. Los esquemas de las estructuras de algunas PTPs importantes están recogidos en la Figura 15. Fosfatasa de este grupo con destacada importancia en el cáncer son PTP1B, SHP2, CD45, FAP-1, PTEN y MKP-1, entre otros.

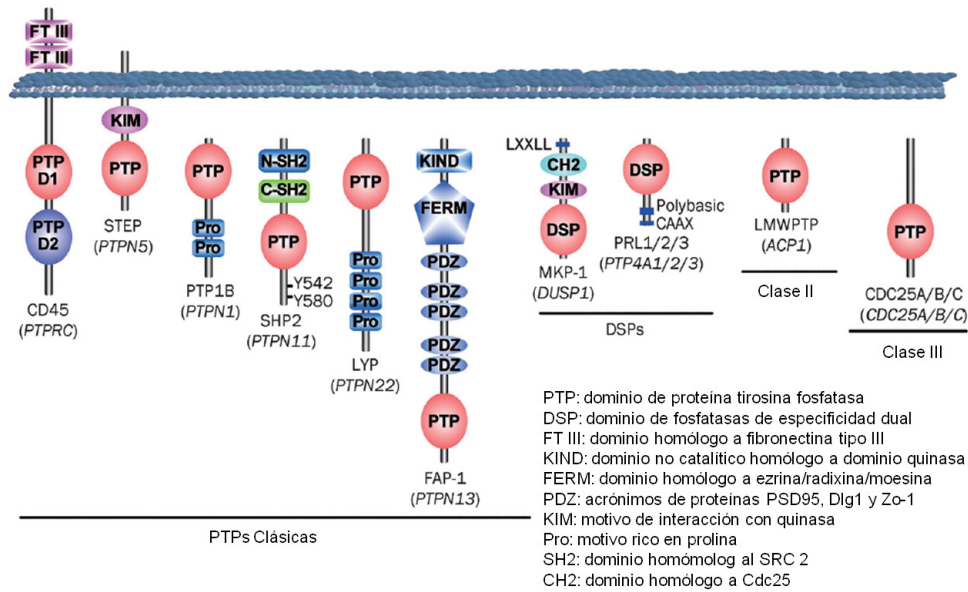


Figura 15. Estructura esquemática de algunos miembros de la superfamilia de las PTPs. Adaptado de “He RJ et al, 2014, Acta Pharmacol Sin”.

Las PSPs son un grupo de unas 30 enzimas que actúan en residuos de serina y treonina, defosforilando en base a la activación de una molécula de agua gracias a la presencia de un ión metálico en su bucle catalítico [133]. Las PSPs pueden dividirse en tres grandes familias: las fosfoproteínas fosfatasa (PPPs), las proteínas fosfatasa dependientes de metales (PPMs) y las fosfatasa basadas en aspartato, representadas por FCP/SCP (factor de transcripción IIF (TFIIF) asociado a los componentes de la ARN polimerasa II CTD de fosfatasa / CTD fosfatasa pequeña).

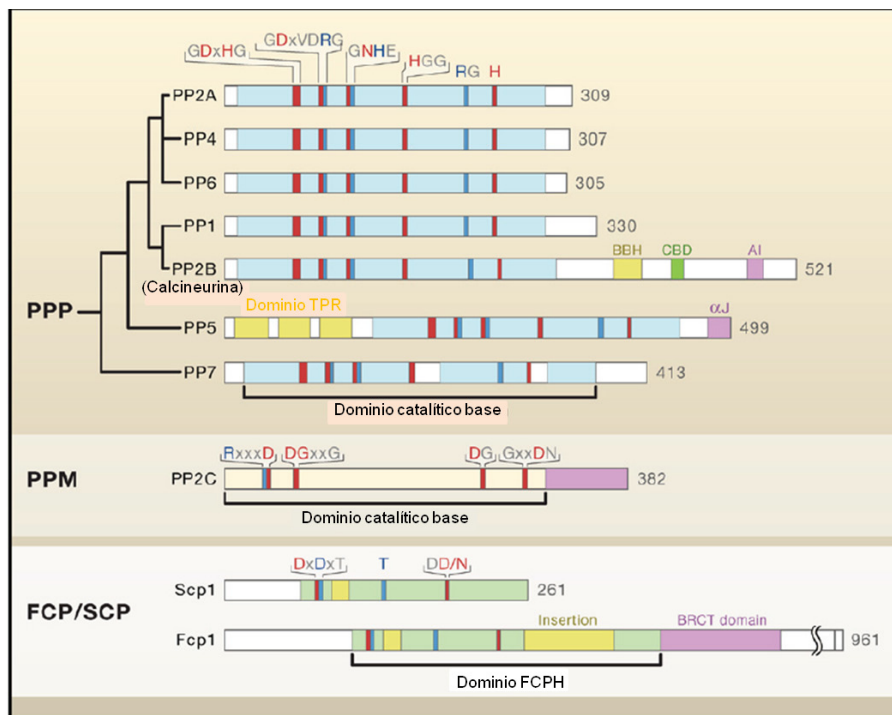


Figura 16. Estructura esquemática de miembros de las tres grandes familias de proteínas serina/treonina fosfatasa. Adaptado de “Shi Y, 2009, Cell”.

Varias fosfatasa PPPs tienen la particularidad de componerse de una subunidad catalítica capaz de asociarse a una gran variedad de subunidades reguladoras [137]. Varios de sus miembros representativos, cuyas secuencias catalíticas se esquematizan en la Figura 16, son: PP1, PP2A, PP2B o calcineurina, PP4, PP5, PP6 y PP7. Las fosfatasa PPMs dependen, para su acción enzimática, de los iones manganeso y magnesio. Ejemplos de este grupo de proteínas son PP2C o la piruvato dehidrogenasa fosfatasa [138].

Al contrario que los dos grupos anteriores, la fosfatasa FCP/SCP no requiere de la activación de una molécula de agua por un ión para su acción enzimática. En cambio, utiliza un mecanismo de catálisis basado en el aspartato [138]. El único sustrato conocido de esta enzima es el CTD de la RNA polimerasa II.

1.4.3. Fosfatasa de MAPK (MKPs). MKP-1

Las denominadas proteínas fosfatasa de MAPK o MKPs son un conjunto de 11 enzimas PTPs pertenecientes, dentro de la clase I, a la familia de las DUSPs [139]. Todas las MKPs muestran una estructura común (Figura 17) que consiste en un CTD catalítico similar al de la fosfatasa dual prototipo VH-1 del Vaccinia virus; y un NTD que contiene dos regiones homólogas al dominio catalítico de la fosfatasa Cdc25 [140]. Además, el NTD también presenta, en todos los casos, una región de aminoácidos básicos crucial para el reconocimiento y la unión a la MAPK específica [141].

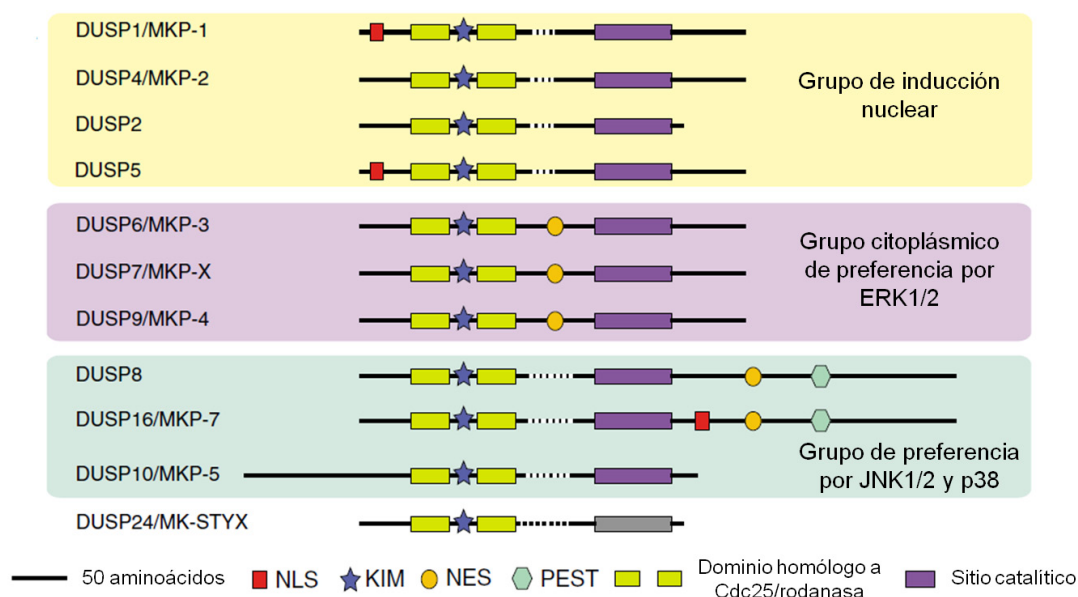


Figura 17. Clasificación por grupos filogenéticos y dominios estructurales de las MKPs. KIM: motivo conservado de interacción con quinasa; NLS: señal de localización nuclear; NES: señal de exportación nuclear; PEST: secuencias ricas en prolina, glutamato/aspartato, serina y treonina. Adaptado de “Dickinson RJ & Keyes SM, 2006, J Cell Sci”.

En cuanto a la similaridad de secuencia, la especificidad por sustrato y la localización subcelular, las MKPs podemos subdividir las en tres grupos [142]:

- MKPs de inducción nuclear: enzimas funcionalmente localizadas en el núcleo, capaces de defosforilar las quinasas ERK1/2, JNK1/2 y p38. La fosfatasa más representativa de este grupo es MKP-1 (DUSP1).

- MKPs citoplásmicas específicas de ERK: fosfatasas de localización citoplásmica que defosforilan específicamente a ERK1/2. Su enzima más representativa es MKP-3 (DUSP6).

- MKPs que defosforilan JNK y p38: fosfatasas citoplásmicas y nucleares que muestran preferencia por defosforilar las quinasas JNK1/2 y p38.

Las fosfatasas MKPs parecen ser proteínas evolutivamente conservadas, con 16 homólogos identificados en *S. pombe*, 6 en *D. melanogaster* y más de 26 en *C. elegans* de acuerdo a sus secuencias genómicas [143]. Su relación funcional con las MAPK no sólo está basada en la acción enzimática unidireccional ejercida por las MKPs, sino que se ha visto que, en algunos casos, la vía MAPK es capaz de controlar la expresión de estas fosfatasas para favorecer efectos moleculares específicos, produciéndose una red de bucles regulatorios complejos entre las MAPK y las MKPs que aún no ha sido del todo aclarada [144].

Una de las MKPs mejor conocidas es la fosfatasa de inducción nuclear MKP-1. Esta fosfatasa, expresada ubicuamente en los tejidos humanos, es capaz de ser inducida por una enorme variedad de estímulos y agentes diferentes, incluyéndose factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, estrés oxidativo y osmótico, hipoxia y daño químico y físico del ADN [145]. Así, el interés que esta fosfatasa provocó en la investigación en cáncer conllevó al progreso en su conocimiento como proteína, como intermediario de respuesta a estrés y como posible biomarcador [146].

La habilidad enzimática de MKP-1 para defosforilar p38, JNK1/2 y ERK1/2 MAPK, en este específico orden de afinidad [147], parece que depende del estímulo celular a desarrollar. Revisando modelos de tratamientos de células de cáncer de mama, algunos de ellos provocaron la defosforilación de ERK1/2 como consecuencia de la mayor expresión de MKP-1 [148, 149]. En otras ocasiones, es JNK1/2 quien medió la respuesta de las células tumorales de mama a los tratamientos, siendo defosforilado por un MKP-1 reactivado [150, 151].

Sea cual sea la MAPK diana de MKP-1 en las diferentes situaciones de estrés o tratamiento, está claro que en el cáncer de mama esta enzima tiene un papel primordial y una relevancia clínica aún por indagar. La defosforilación de JNK1/2 por MKP-1 se ha correlacionado

con la progresión y la supervivencia al cáncer de mama frente a la quimioterapia [150, 152]. Además, la capacidad de respuesta antitumoral de MKP-1 ha llegado a considerarse como quimiorresistencia adquirida en las células tumorales de mama [151], y sólo cuando un agente ha sido capaz de inhibir la expresión de esta fosfatasa se han logrado efectos antitumorales tras los tratamientos a la par que la activación de las MAPK [153].

En vista de este panorama de resultados publicados, el papel de MKP-1 como modulador activo tanto de la progresión tumoral como de la resistencia frente al estrés la convierten en una diana potencial a inhibir en la terapia antitumoral [154]. Sin embargo, nuestro grupo descubrió que, aunque el fármaco doxorrubicina inhibió eficazmente MKP-1 en la mayoría de los tumores de mama; un pequeño subgrupo, con muy elevada expresión de MKP-1, no mostraba dicha inhibición tras el tratamiento, manteniéndose las MAPK sin fosforilar [153].

En consecuencia, aunque es bastante evidente que la fosfatasa MKP-1 juega un papel clave en la progresión tumoral de mama, es necesario aclarar mejor su potencial molecular y clínico en este tipo de cáncer.

1.4.4. Fosfoproteínas fosfatasas (PPPs). PP2A

La mayoría de las 30 enzimas PSPs que se conocen son fosfoproteínas fosfatasas (PPPs). Este reducido número, en comparación con las PTPs, se piensa que es debido a que las PPPs son, en realidad, holoenzimas cuya estructura resulta de la combinación de un pequeño grupo de subunidades catalíticas con un gran número de subunidades reguladoras posibles [138].

Un miembro destacado de esta familia de enzimas es la fosfoproteína fosfatasa 2A (PP2A). Esta enzima puede conformarse como enzima nuclear heterodimérica, donde una subunidad de soporte (conocida como subunidad A o PR65) interacciona con una subunidad catalítica (conocida como subunidad C); o como una holoenzima heterotrimérica (Figura 18), donde la enzima nuclear PP2A interacciona con una variable subunidad reguladora (que puede ser la subunidad B, B55 o PR55; la subunidad B', B56 o PR61; la subunidad B'', PR48, PR72 o PR130; o la subunidad B''', PR93 o PR110) [155].

PP2A es una proteína altamente conservada en la evolución, con un alto grado de conservación de secuencia aminoacídica en comparación con otros organismos, como *D. melanogaster* y *S. pombe*, siendo sus subunidades catalíticas las más conservadas de las presentes en cualquier enzima conocida [156, 157]. Esta proteína es una de las más abundantes en las células

humanas, desempeñando papeles clave en numerosas funciones celulares como el desarrollo, la proliferación celular y la muerte, el control del ciclo celular y la regulación de varias vías de señalización [155].

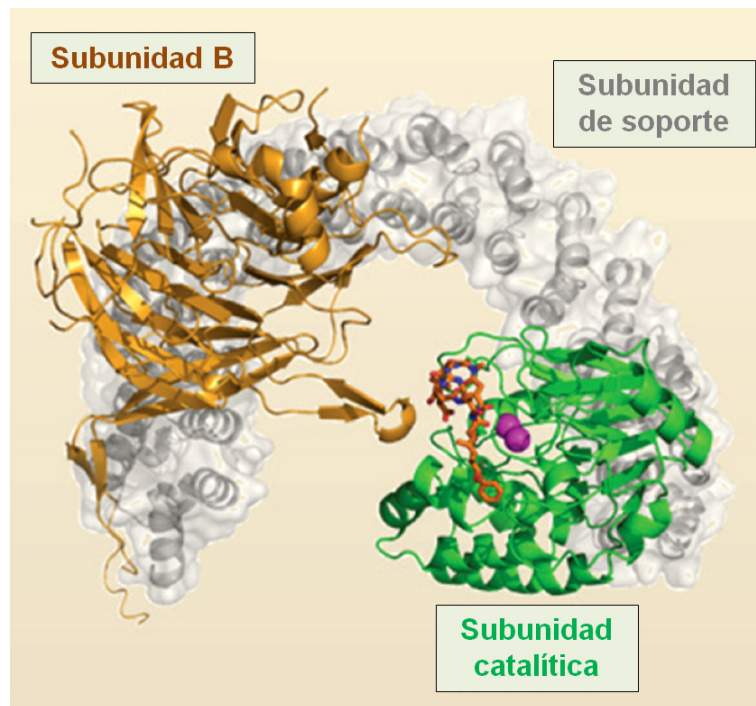


Figura 18. Plegamiento estructural de la holoenzima heterotrimérica PP2A conteniendo la subunidad reguladora B. Adaptado de “Shi Y, 2009, Cell”.

En lo relativo al cáncer, se sabe que la enzima PP2A es capaz de controlar vías moleculares clave en el desarrollo del cáncer humano (progresión del ciclo celular, apoptosis...), desarrollando un papel de supresor tumoral [158, 159]. En líneas celulares de leucemia, PP2A fue capaz de regular la quinasa p38 en relación a la coexpresión con ERK1/2 y a la activación de apoptosis [160, 161]. Además, se han descrito varios mecanismos de inhibición de PP2A en células tumorales, incluyéndose alteraciones de las subunidades que componen la holoenzima PP2A, su hiperfosforilación y su interacción funcional con inhibidores endógenos presentes en estas células, como CIP2A o SET [159, 162-164].

En cáncer de mama, observamos un panorama demostrado tanto de inhibición de la regulación como de mutaciones inhibitorias de PP2A [165, 166]. La inhibición de SET en células de cáncer de mama redujo la proliferación celular, lo cual señaló a este inhibidor endógeno de PP2A como posible diana terapéutica [167]. Además, CIP2A se asoció con la sensibilidad de las células de cáncer de mama a diferentes agentes, al igual que se demostró que modelos *in vivo* con deficiencias en este inhibidor de PP2A resistían mejor a la tumorigénesis de mama [168-170].

En resumen, está claro que la fosfatasa PP2A juega un papel clave en el desarrollo del cáncer de mama. Sin embargo, una proteína tan ubicua y con una capacidad de acción en tantas vías de señalización celular requiere una mayor profundización en el contexto molecular y terapéutico de la tumorigénesis mamaria.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las proteínas MKP-1 y PP2A tienen un importante potencial como biomarcadores del cáncer de mama.

Para confirmar o rechazar esta hipótesis, en la presente Tesis Doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

a) Determinar in vitro la modulación de MAPK y MKP-1 en respuesta a la quimioterapia (docetaxel y doxorubicina) en el cáncer de mama.

b) Estudiar in vitro el papel de la sobreexpresión de MKP-1 como factor de quimiorresistencia (docetaxel y doxorubicin) en el cáncer de mama.

c) Confirmar el valor de predicción del beneficio a la quimioterapia (doxorubicina y docetaxel) de MKP-1 en pacientes con cáncer de mama.

d) Caracterizar in vitro la regulación y la activación de PP2A en diferentes subtipos moleculares de cáncer de mama.

e) Establecer in vitro e in vivo el papel de PP2A como factor de quimioresistencia (doxorubicina) en cáncer de mama.

f) Investigar el valor de predicción del beneficio a la quimioterapia (doxorubicina) de PP2A en pacientes con cáncer de mama.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Líneas celulares de cáncer de mama

Para la experimentación in vitro de este trabajo, se utilizaron las siguientes líneas celulares de cáncer de mama: MDA-MB-231, BT-474, MDA-MB-468, MCF-7 y SK-BR-3. Las características moleculares básicas de cada una de estas líneas celulares vienen indicadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Características moleculares básicas de 5 líneas celulares de carcinoma de mama. Adaptado de “Neve RM et al (2006). Cancer Cell”, “Barretina J et al (2012). Nature”, “Riaz M et al (2013). Breast Cancer Res” y “Vora SR et al (2014). Cancer Cell”.

	MDA-MB-231	BT-474	MCF-7	MDA-MB-468	SK-BR-3
Subt. molecular	Bajo en claudina	Luminal	Luminal	Subtipo basal	Luminal-ERBB2+
ER	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
PR	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
ERBB2	Negativo	Sobreexpresado	Negativo (ERBB4 Mutado)	Negativo (ERBB4 Mutado)	Sobreexpresado
EGFR	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
TP53	Mutado	Mutado			Mutado
PI3K/AKT	PIK3CA, PIK3CG...	PIK3CA, AKT1	PIK3CA	PIK3C2B, PIK3C2A...	
VEGF	Mutado	Mutado	Mutado	Mutado	Mutado
KRAS	Mutado				
BRAF	Mutado				
PARP1		Mutado			
BRCA		BRCA2			
MAPK	MAP3K9	MAPK1, MAPK13...	MAP3K14, MAP3K13...	MAP3K5, MAP3K1...	MAP3K14
EIF	EIF4EBP1	EIF4B, EIF4E	EIF2AK4	EIF2AK4	EIF4A2
ERCC		ERCC6		ERCC6	ERCC3
NFKB		NFKB1, NFKB2			
MET			Mutado	Mutado	Mutado
PTEN				Mutado	
KIT					Mutado

Todas las líneas celulares fueron obtenidas de la American Type Culture Collection, y en determinados periodos de tiempo fueron testadas por PCR tanto para su autenticidad como para su posible contaminación por las especies más comunes del género *Mycoplasma*. Estas células fueron cultivadas en monocapa con medio de cultivo DMEM/F12 (Sigma), 10% de suero fetal bovino (Life Tech), 2 nmol/L de glutamina (Gibco), 100 U/ml de penicilina (Gibco), 100 µg/mL de estreptomycin (Gibco); en incubadores de CO₂ con estabilidad de condiciones de 37°C y 5% de CO₂.

El cultivo de estas células se realizó en frascos especialmente preparados para el crecimiento celular en monocapa, normalmente de 75 cm². Los subcultivos, tanto para el mantenimiento del cultivo como para el uso de la siembra de experimentos, se realizaron en cabinas de cultivo de tipo II y en cultivos que no excedieran el 70% de confluencia, utilizando para los mismos soluciones de tripsina/EDTA 0,25% (Gibco). Para controlar el número de células a sembrar en el subcultivo o en los experimentos, las células tripsinizadas fueron cuantificadas utilizando la tinción nuclear azul tripán (Bio-Rad).

Para la obtención de clones celulares resistentes a doxorrubicina, tratamos células MDA-MB-231 y BT-474 con ciclos sucesivos de crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de este fármaco, comenzando con 0,5 $\mu\text{mol/L}$. El proceso de adquisición de resistencia finalizó a los 6 meses tras el comienzo de los tratamientos. El nivel exacto de esta resistencia se cuantificó realizando ensayos de viabilidad celular, por ensayo MTS, de los clones resistentes frente a varias concentraciones de la antraciclina a 24 horas de tratamiento. Los valores de IC_{50} resultantes se compararon con los valores de IC_{50} de células parentales de cada línea celular utilizando el valor de ratio IC_{50} :

$$\text{Ratio IC}_{50} = \text{IC}_{50} \text{ células resistentes a doxorrubicina} / \text{IC}_{50} \text{ células parentales.}$$

3.2. Modelo murino de cáncer de mama

Para validar parte de los resultados obtenidos *in vitro* en este trabajo, se realizó un modelo animal subcutáneo de cáncer de mama, en colaboración con el grupo de Investigación de Terapia Molecular del Cáncer del Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (Barcelona). Todo el proceso del modelo animal fue controlado y dirigido siguiendo las guías del comité científico de bienestar animal institucional del Parque de Investigación Biomédica de Barcelona.

Se eligió para el modelo animal ratones hembras de 46 semanas de edad del fenotipo Balb/C, que corresponde al ratón albino clásico. Esta cepa de ratones de experimentación animal ha sido utilizada en numerosos estudios de cáncer, inmunología y otras enfermedades en base sobre todo a su baja carga inmunológica genéticamente establecida en los mismos [171].

Se realizó un xenoinjerto ortotópico en un total de 40 ratones de esta cepa, inoculando en su flanco derecho 10^6 células MDA-MB-231 previamente mezcladas en esterilidad con la matriz proteica comercial Matrigel (BD Biosciences) por administración subcutánea. Desde el día de la inoculación de las células tumorales, se midió el crecimiento de los tumores subcutáneos dos veces a la semana.

Cuando los ratones consiguieron desarrollar tumores con unos tamaños entre 100 y 150 mm^3 (entre 1 y 2 semanas tras la administración celular subcutánea), fueron distribuidos en cuatro grupos experimentales, de manera homogénea.

Grupo 1: administración intraperitoneal de solución salina, en ausencia de fármaco activo. Se consideró el grupo control del modelo experimental.

Grupo 2: administración intraperitoneal de 2 mg/kg de doxorrubicina en solución salina, dos veces a la semana [172].

Grupo 3: administración intraperitoneal de 10 mg/kg de FTY720 en solución salina, una vez cada dos días [173].

Grupo 4: administración intraperitoneal de 2 mg/kg de doxorubicina en solución salina, dos veces a la semana; y de 10 mg/kg de FTY720 en solución salina, una vez cada dos días. Es el grupo combinatorio entre los dos fármacos.

Durante todo el modelo experimental, en paralelo a la administración de los fármacos según las condiciones experimentales previamente descritas, se siguieron realizando las medidas de las dimensiones de los tumores subcutáneos dos veces a la semana. Además, se controló en todo momento el bienestar animal de los ratones, especialmente del grupo control, siguiendo en todo momento la Directiva Europea 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

A las 5 semanas desde la administración de las células tumorales en los ratones, el modelo experimental se dio por finalizado. Así, se realizó el correspondiente sacrificio de los ratones adquiriéndose de cada uno el tumor subcutáneo producido, que se incluyó en un bloque fijado en formol y embebido en parafina (bloques FFPE). Estos tumores fueron utilizados para determinar la expresión de las proteínas fosfohistona H3, caspasa 3 truncada, p-PP2A, CIP2A y SET mediante la técnica de inmunohistoquímica.

3.3. Muestras de pacientes de cáncer de mama

Con el fin de realizar una validación clínica de los resultados *in vitro* obtenidos en este proyecto de investigación, se recopilaron dos series de 350 y 240 muestras de tumores de cáncer de mama de 3 centros distintos: biobanco del Parc de Salut Mar (MARBiobanc, Barcelona), biobanco de la Fundación Jiménez Díaz (Madrid) y biobanco del Hospital Clínico de Valencia (Valencia). Las biopsias tumorales de los bloques FFPE fueron seleccionadas retrospectivamente de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama entre los años 1998 y 2000, siguiendo los siguientes criterios: carcinomas invasivos, operables, sin terapia neoadyuvante, con suficiente tejido disponible y seguimiento clínico. Tuvimos una disposición completa de estos datos registrados por los facultativos, para la totalidad de las pacientes incluidas en el estudio.

En paralelo, se añadieron al estudio dos series independientes de 64 y 35 pacientes con cáncer de mama localmente avanzado tratados con quimioterapia neoadyuvante del biobanco de la Fundación Jiménez Díaz (Madrid). En concreto, se utilizaron las biopsias de estos tumores previas a la cirugía. El estadiaje de estos pacientes pre-tratados se realizó utilizando el sistema implantado por el Comité Conjunto sobre Cáncer de Estados Unidos (AJCC) para el cáncer de

mama. La respuesta clínica del tumor a la quimioterapia primaria se evaluó de acuerdo con el Criterio de la Unión Internacional Contra el Cáncer [174]. La respuesta clínica completa (cCR) se define como la desaparición total de cualquier resto de enfermedad maligna localizada junto a la mama por examinación física. Una reducción mayor del 50% en el producto resultante de los dos diámetros perpendiculares máximos se clasificó como respuesta parcial clínica (cPR). Un incremento de al menos el 25% se consideró enfermedad clínica progresiva (cPD). La enfermedad clínica estable (cSD) se definió cuando la respuesta clínica del cáncer de mama no alcanzó ninguno de los tres criterios de enfermedad anteriores. Las biopsias posteriores a la quimioterapia fueron cuantificadas para hallar la respuesta patológica, siendo completa (pCR) cuando se dejaba de detectar histológicamente cualquier indicio de enfermedad invasiva del tumor [175].

Para completar algunos resultados relativos a la resistencia a doxorrubicina, se utilizaron secciones de tejido mayores de 1,5 cm procedentes de especímenes frescos de pacientes de reciente diagnóstico de carcinoma de mama invasivo para realizar tratamientos *ex vivo* con este fármaco para evaluar efectos moleculares [176]. Estas biopsias en fresco se procesaron en condiciones estériles tras la extirpación quirúrgica. Las incubaciones en medio de cultivo o con el fármaco doxorrubicina se realizaron en placas de 24 pocillos en condiciones de 37°C y 5% de CO₂, durante 24 horas. Tras este proceso, las muestras fueron fijadas en formol y embebidas en parafina para, finalmente, ser utilizadas en las determinaciones de marcadores moleculares de interés por inmunohistoquímica.

La estadificación TNM (del inglés, tumor-ganglio-metástasis) se clasificó utilizando el sistema de estadiaje del Comité Americano en Cáncer (AJCC). El grado histológico fue definido de acuerdo a la graduación de Scarff-Bloom-Richardson modificada por el criterio de Elston [177].

Los datos clínicos de los pacientes fueron recopilados por oncólogos a partir de los registros de los facultativos. El comité ético y las diferentes juntas de revisión clínica institucionales aprobaron este proyecto y el uso de estas muestras.

3.4. Ensayos celulares

3.4.1. Tratamientos con fármacos y agentes

Los fármacos doxorrubicina y docetaxel (Sigma) fueron diluidos hasta un stock de concentración 10 mmol/L en agua estéril y etanol al 13%, respectivamente. El fármaco FTY720 (Calbiochem) se diluyó hasta una concentración de 5 mmol/L en DMSO. Otros agentes que se utilizaron fueron ácido okadaico y Ro-31-8220, diluidos en agua estéril; anisomicina y SP6000125,

diluidos en DMSO (Sigma). Las concentraciones de uso de los diferentes agentes y fármacos variaron según la experimentación específica y se prepararon en condiciones de esterilidad en cabina de cultivo tipo II.

En el caso del tratamiento del modelo de sobreexpresión *in vitro* de MKP-1, las diferentes puestas a punto de los agentes moduladores de JNK1/2 y MKP-1 se concluyeron en el siguiente protocolo a la hora de combinar transfecciones, agentes y quimioterápicos:

1. Cultivo de células de carcinoma de mama en placas de 24 pocillos.
2. Transfección con los vectores pCMV-HA-CT y pCMV-HA-MKP-1 durante 24 horas.
3. Crecimiento con los agentes:
 - a. Anisomicina, 30 minutos a 20 ng/mL
 - b. SP6000125, 1 hora a 20 ng/mL
 - c. Ro-31-8220, 6 horas a 5 µg/mL
4. Tratamiento con los fármacos docetaxel (50 nmol/L) y doxorrubicina (10 µmol/L) durante 24 horas.

3.4.2. Ensayo de crecimiento celular

El ensayo de crecimiento celular realizado en este trabajo fue un ensayo colorimétrico de crecimiento en la superficie (en placa multipocillo de 12 pocillos) utilizando una solución de cristal violeta al 0,2% de etanol en 0,5 mol/L de tampón Tris-Cl a pH 7,8.

Tras la condición experimental realizada, las células se lavaron con PBS 1X y teñidas con la solución de cristal violeta. Tras un minuto en contacto con el colorante, las células teñidas en monocapa fueron lavadas con sucesivos pases de PBS 1X para luego ser fotografiadas con una cámara Olympus acoplada a un microscopio invertido. De cada condición experimental se obtuvieron tres fotos de aumento 10x representativas de las células teñidas para luego ser cuantificadas con el programa Adobe Photoshop. La cuantificación de las fotografías se basó en el espacio ocupado por las células teñidas con respecto al espacio total del campo. Esta forma de cuantificación de imágenes fue previamente realizada por Lozano D. y colaboradores [178].

3.4.3. Ensayo de viabilidad celular

El ensayo de viabilidad celular seleccionado fue un ensayo colorimétrico de viabilidad en superficie (en placa multipocillo de 96 pocillos), utilizando una solución comercial de la sal de tetrazolio MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) [179] (Promega).

En presencia de determinadas enzimas mitocondriales, esta sal es capaz de producir formazán, cuya absorbancia a 460 nm de longitud de onda puede ser detectada en un espectrofotómetro de placas. Por indicación del kit comercial, se debe realizar una cuantificación principal a 460 nm y otra cuantificación de referencia a 620 nm, siendo el resultado final de absorbancia la diferencia entre ambas medidas.

Tras la condición experimental específica, el pocillo con las células y medio de cultivo se rellena con 20 µl del ensayo MTS para ser cuantificado dos horas después de añadirlo.

3.4.4. Cuantificación de apoptosis

En este trabajo, se cuantificaron los niveles de apoptosis con dos metodologías distintas.

Con los experimentos relativos a los tratamientos con FTY720 y doxorrubicina, la activación de la apoptosis de las células de cáncer de mama se cuantificó con el kit comercial Caspase-Glo® 3/7 Assay [180] (Promega). Este ensayo permitió cuantificar células en los inicios de activación de apoptosis. El protocolo consistió en añadir a células sembradas en placas de 96 pocillos un sustrato luminogénico de las caspasas 3 y 7. Tras 90 minutos de incubación a temperatura ambiente, la rotura del sustrato por acción de las caspasas y, en consecuencia, la intensidad de la señal luminiscente se cuantificó en el luminómetro FLUOstar OPTIMA (MBG Labtech).

En los experimentos de tratamientos con doxorrubicina y docetaxel, la activación de la apoptosis de las células de cáncer de mama se cuantificó con el kit comercial Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit I [181] (Becton Dickinson). Este kit consiste en una doble tinción de las células en suspensión con anexina V e yoduro de propidio. De esta forma, las células a detectar se encontraban en apoptosis temprana (positivas para anexina V) o apoptosis tardía (positivas para anexina V e yoduro de propidio). Tras la condición experimental, las células fueron tripsinizadas, lavadas con PBS 1X y diluidas en un tampón específico del kit. Esas células diluidas fueron teñidas entre 15 y 30 minutos con la doble tinción. Pasado este tiempo, las células fueron cuantificadas en

el citómetro de flujo FACS CANTO II (Becton Dickinson). El dato de apoptosis recogido fue el porcentaje de células teñidas con anexina V; es decir, se sumaron las células positivas para anexina (apoptosis temprana) con las dobles positivas para anexina e ioduro de propidio (apoptosis tardía).

3.4.5. Generación de mamósferas

Para la generación de esferas a partir de líneas celulares de cáncer de mama, fue necesaria la preparación de un medio stem-like y placas de baja adhesión de 6 pocillos. El medio stem-like se compone de: medio DMEM-F12, 2 nmol/L de glutamina, 100 U/ml de penicilina (Gibco), 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco), 1% de N2, 2% de B27, 20 ng/ml de FGFβ y 50 ng/ml de EGF.

Alrededor de 10^4 células fueron sembradas en cada pocillo de placa de baja capacidad de adhesión en medio stem-like. Entre 3 y 5 días después, se observaron por el microscopio invertido la formación de esferas en suspensión. Este cultivo de esferas se intentó con células MDA-MB-231 y BT-474, pero solo se consiguió con células BT-474.

Con esta metodología de formación de mamósferas, se realizaron dos experimentos diferentes:

1. Tratamiento de células BT-474 creciendo en condiciones stem-like con fármacos para testar su capacidad de impedir la formación de las esferas. Se determinó el número de esferas formadas.

2. Generación de mamósferas de células BT-474 y tratamiento de las mismas con diferentes fármacos, una vez formadas, durante 48 horas. Se determinó el número de esferas tras los distintos tratamientos y el número de células viables por esfera, para lo cual se disgregaron las mismas con tripsina/EDTA y se cuantificaron por tinción con azul tripán.

3.4.6. Transfección de células

Para realizar los experimentos de transfección, las células MDA-MB-231 y BT-474 fueron cultivadas en placas de 6, 12 o 24 pocillos, según el caso. El agente utilizado para realizar la transfección fue el lípido catiónico sintético Lipofectamine 2000 (Life Technologies), el cual se usó en un rango de entre 6 y 10 mL por pocillo según el formato de placa multipocillos requerida. Este agente transfectador se diluyó, para todos los experimentos, en el medio especial Opti-MEM (Life Technologies).

Aunque los tiempos de incubación de las células con las mezclas de transfección fueron variables, en general rondaron las 4-6 horas como mínimo. Antes de poner las células en contacto con estas mezclas, tuvieron que ser cultivadas en medios al 13% de suero fetal bovino y en ausencia de antibióticos. Además, la confluencia ideal para la realización de todos estos tipos de transfecciones no varió mucho del 70% de confluencia en ambos tipos celulares.

En el caso de los experimentos de sobreexpresión de MKP-1, fue necesaria la construcción de un vector de transfección compatible con células eucariotas. El clon de ADNc de MKP-1 insertado en el plásmido pBluescriptR (Figura 19; Open Biosystems, Dharmacon) fue ampliado mediante el uso de las células competentes DH5α (Life Technologies) y kits de MiniPreps (Qiagen); y secuenciado para comprobar que la secuencia del gen de MKP-1 era la correcta. Para ello, realizamos alineamiento de secuencias entre los resultados de la secuenciación del plásmido adquirido y las secuencias contenidas en las bases de datos del NCBI:

- “DUSP1 dual specificity phosphatase 1 [Homo sapiens]; Gene ID: 1843, updated on 12-Jul-2011”.
- “Homo sapiens dual specificity phosphatase 1 (DUSP1), mRNA; NCBI Reference Sequence: NM_004417.3”.

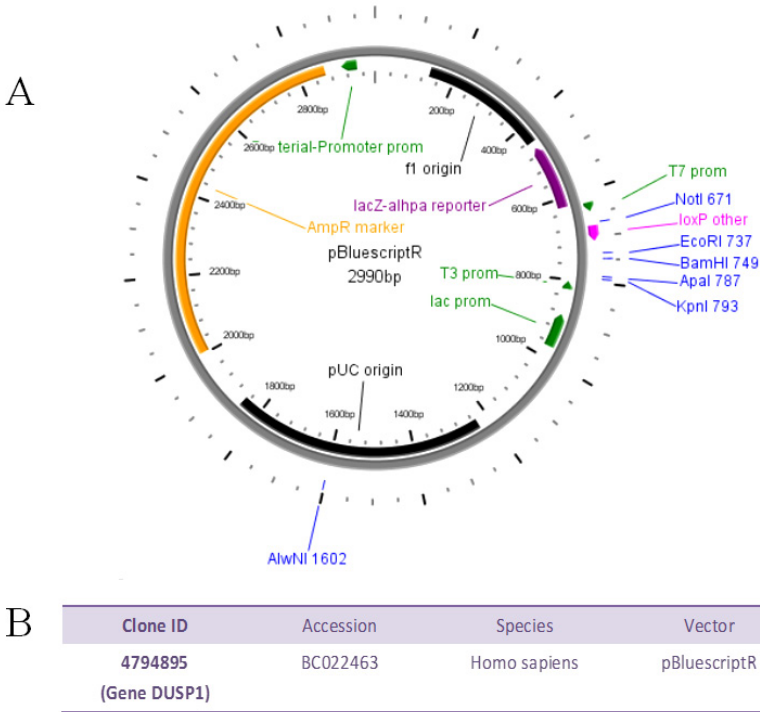


Figura 19. Clon de ADN complementario de MKP-1 utilizado para la sobreexpresión del gen en células de carcinoma de mama. A) diagrama esquemático del plásmido pBluescriptR. B) datos del clon de MKP-1 adquirido (Open Biosystems, Dharmacon).

Para las secuenciaciones, utilizamos oligonucleótidos específicos de zonas conocidas del plásmido pBluescriptR y unos nuevos oligonucleótidos diseñados específicamente para la detección de MKP-1. Todos los alineamientos y diseños de oligonucleótidos se realizaron en el software DNASTAR (Inc, Madison, WI). De entre todos los oligonucleótidos diseñados para las

detecciones de MKP-1, una vez conseguidos vectores de transfección de MKP-1 compatibles con nuestras células de carcinoma de mama, seleccionamos una pareja diseñada para poder ser utilizada posteriormente en la cuantificación de la expresión génica de MKP-1 por PCR cuantitativa a tiempo real (Figura 20A). Esos diseños de oligonucleótidos, además, fueron testados para su especificidad a la hora de detectar el ARN mensajero de MKP-1 utilizando la base de datos Standard Nucleotide BLAST.

Una vez comprobado el clon, se realizó un protocolo de digestión y ligación para obtener vectores de transfección de MKP-1 candidatos para transfectar las células tumorales de mama. Los vectores testados fueron el vector de expresión en mamíferos pCMV-HA (Cat. No. 631604; Clontech) y el vector de expresión en eucariotas pIRES2-EGFP (Cat. No. #6029-1; Clontech) (Figura 20B y 20C). Las enzimas de restricción utilizadas fueron EcoRI y KpnI en el caso de la ligación entre pBluescriptR-MKP-1 y pCMV-HA; y las enzimas EcoRI y BamHI en la ligación entre pBluescriptR-MKP-1 y pIRES2-EGFP. Las nuevas construcciones fueron, de nuevo, crecidas en las células competentes DH5 α para obtener extractos concentrados de las plásmidos de transfección con elevada pureza gracias a kits de MaxiPreps (Qiagen).

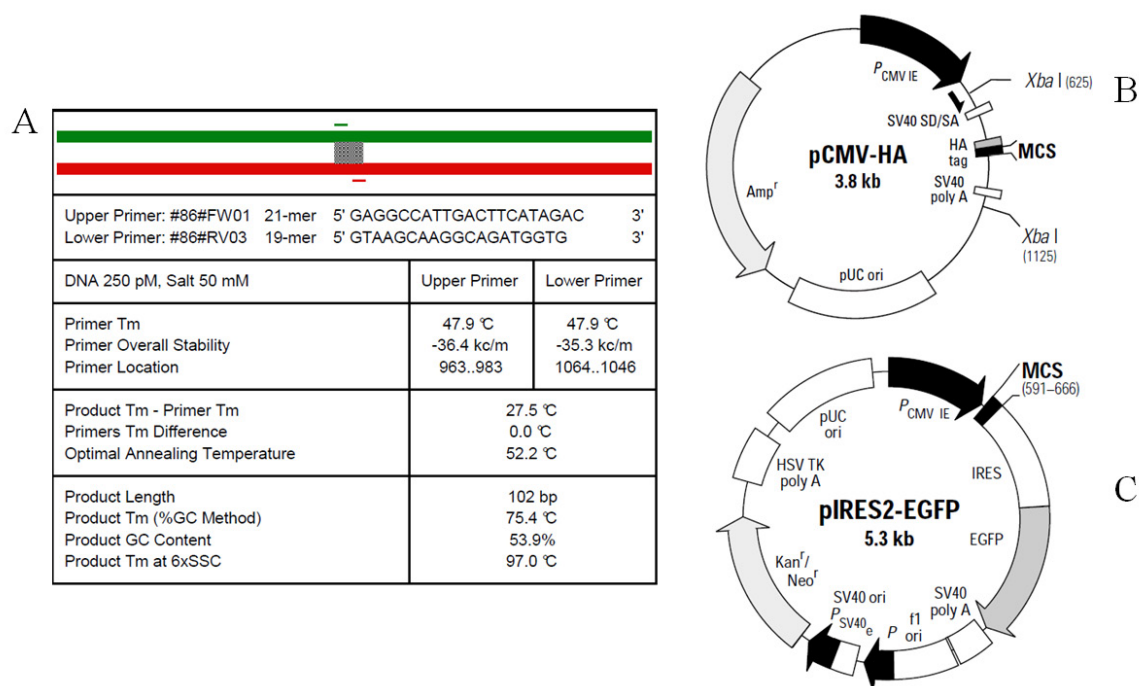


Figura 20. Construcción de plásmidos de transfección para sobreexpresar MKP-1 en células de carcinoma de mama. A) resumen del resultado de amplificación de la secuencia de ARN mensajero de MKP-1 (NM_004417.3) con los oligonucleótidos diseñados para su detección (DNASTAR, Inc, Madison, WI). B) diagrama del vector de expresión en mamíferos pCMV-HA. C) diagrama del vector de expresión en eucariotas pIRES2-EGFP.

En el caso de los experimentos de silenciamientos de SET y CIP2A, para cada transfección se utilizaron 75 nmol/L de los ARNsi específicos para SET y CIP2A, diseñados y sintetizados por Dharmacon para su uso en este tipo de ensayos.

3.5. Ensayos moleculares

3.5.1. *Análisis de perfiles de expresión por arrays*

Para este tipo específico de análisis de la expresión génica, se obtuvieron extractos de ARNm utilizando un kit comercial específico de extracción de ARN total basado en columnas (RNeasy mini Kit, Qiagen). Una vez obtenido el ARNm total, éste fue analizado en el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (NanoDrop Technologies,), obteniendo datos de pureza, integridad y concentración del ARNm extraído. Para los experimentos de microarrays de expresión, se consideró válida una pureza de ARNm con los criterios mínimos de $A_{260}/A_{280} > 2.0$, $A_{260}/A_{230} > 1.4$ y $RIN > 9.4$.

Los perfiles de expresión en arrays se analizaron en la plataforma Affymetrix GeneChip Human Exon 1.0 ST Array (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA). En el proceso, se amplificaron 200 ng de ARNm total utilizando el kit de expresión Ambion WT (Applied Biosystems), para posteriormente ser marcado usando el kit de marcaje WT Terminal (Affymetrix) y finalmente ser hibridado con array Human Exon 1.0 ST durante 16 horas a 45°C en el horno de hibridación GeneChip 640. Tras el paso de hibridación, cada array se tiñó en la Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 y escaneado usando el escáner GeneChip 3000 7G. Los análisis de perfiles de expresión resultantes de estos análisis de microarrays fueron realizados por Affymetrix en base a normalizaciones específicas de cuantificación por multipocillos y a modelos estadísticos moderados en base a la distribución de la T de Student.

3.5.2. *Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa*

La técnica de obtención de extracto total de ARNm utilizada fue, en este caso, el trizol-cloroformo [182] (TRIZol reagent, Invitrogen). Para la cuantificación por PCR cuantitativa a tiempo real, los ARNm fueron transcritos a ADNc utilizando el kit comercial Transcriptor Universal cDNA Master (Roche Life Science). En el caso de la cuantificación de MKP-1, se utilizó un diseño de cebadores propio, realizado con el software DNASTAR Primer design software (DNASTAR, Inc, Madison, WI) y la base de datos “Nucleotide” del NCBI. El diseño final fue el siguiente:

MKP-1 (NM_004417.3)

Fw: 5'-GAGGCCATTGACTTCATAGAC-3'

Rv: 5'-GTAAGCAAGGCAGATGGTG-3'

Como gen de referencia, se realizó un diseño propio del gen de ATP5E, con la misma metodología:

ATP5E (NM_006886.3)

Fw: 5'-GTAGCTGAGTCCAGCCTGTC-3'

Rv: 5'-GATCTGGGAGTATCGGATG-3'

Para la detección de estos genes en nuestros ADNc, se seleccionaron sondas específicas de la “Universal probe library” (Roche Applied Science, Mannheim, GE) para cada pareja de cebadores. Esta PCR cuantitativa a tiempo real se realizó en la plataforma Lightcycler 480 RT PCR-System (Roche Applied Science, Mannheim, GE) a 45 ciclos de PCR. La expresión génica relativa se calculó de acuerdo al método del doble incremento de ciclo [183].

En el caso de las cuantificaciones por PCR cuantitativa a tiempo real de los genes CIP2A, PP2A-c, PP2A-alfa, PP2A-beta y SET, se utilizaron ensayos comerciales de cebadores y sondas TaqMan específicas para cada gen (Applied Biosystems). Como gen de referencia, se utilizó un ensayo TaqMan específico para el gen GAPDH. La obtención de ADNc a partir de ARNm fue idéntica al caso de MKP-1 descrito anteriormente. La plataforma de PCR cuantitativa a tiempo real utilizada en este caso fue la 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). La expresión génica relativa se calculó de acuerdo al método del doble incremento de ciclo [183].

3.5.3. Análisis de proteínas por western blotting

La extracción de proteína total se realizó a partir de la técnica del trizol-cloroformo [182] (TRIZol reagent, Invitrogen). Los extractos totales de proteínas se cuantificaron por el método del derivado colorimétrico del ácido bicinconínico o BCA [184], para lo cual fue necesaria la cuantificación por espectrofotometría óptica de la absorbancia de este derivado a 562 nm de longitud de onda.

Entre 20 y 30 µg de extracto total de proteínas se cargaron en geles SDS-PAGE. Dichos extractos fueron previamente preparados con un tampón de carga al 4X (1% de DTT, 2% de SDS y 0,003% de azul de bromofenol). Los geles SDS-PAGE se polimerizaron al 10 o 12% de

acrilamida/bis-acrilamida, según el caso. La electroforesis de estas proteínas cargadas en los geles SDS-PAGE se realizó a un voltaje constante de 150V durante unos 90 minutos. Posteriormente, los geles SDS-PAGE fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa en condiciones de ausencia de SDS y presencia de metanol al 20%. Esta electrotransferencia se realizó a un voltaje constante de 100V durante 1 hora y a 4°C de temperatura.

Las membranas resultantes del proceso de electrotransferencia de proteínas pasaron al proceso de inmunodetección. Inicialmente, fueron bloqueadas con tampón de bloqueo (albúmina de suero bovino al 5% en TBS y en presencia de 0,05% de Tween-20) durante un tiempo estimado entre 30 minutos y 1 hora. Al finalizar, se lavaron con TBS al 0,1% de Tween-20, en 3 ciclos de 10 minutos. Luego, se incubaron con el anticuerpo primario diluido en tampón de bloqueo en ausencia de Tween-20; el tipo de dilución y el tiempo de incubación fueron distintos según el anticuerpo y los extractos presentes en cada membrana. Tras finalizar esta incubación, se repitió el lavado realizado tras el bloqueo. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente según el primario utilizado previamente: anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra. En unas ocasiones, se utilizaron anticuerpos secundarios para detección por peroxidasa; en otras, se utilizaron anticuerpos secundarios para detección por fosfatasa alcalina. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron y revelaron por quimioluminiscencia con el kit ECL (Amersham, GE Healthcare) en el caso de la detección con peroxidasa; o con los reactivos Tropix CSPD y Tropix Nitro Block II (Applied Biosystems) para la detección con fosfatasa alcalina.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-MKP-1 (Santa Cruz Biotech), Anti-ACTIVE JNK pAb (p-JNK; Thr183/Tyr185) (Promega); anti-GAPDH y anti- β -Actin (Sigma-Aldrich); anti-SET y anti-CIP2A (Abcam); anti-PP2A Y307 (Epitomics); anti-JNK, anti-phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2; Thr202/Tyr204), anti-ERK1/2, anti-pAKT y anti-AKT (Cell Signalling).

3.5.4. Inmunohistoquímica

Las inmunotinciones se realizaron en secciones de tejido de 3 μ m de espesor de los bloques FFPE obtenidas por cortes en microtomos (Leica). Los cortes debidamente colocados en portaobjetos especialmente preparados para las inmunotinciones tuvieron un proceso previo consistente en una recuperación antigénica a alta temperatura en presencia de un tampón de EDTA a pH 9 (Dako). Tras esta recuperación antigénica, los portaobjetos fueron incubados con el anticuerpo primario correspondiente y a continuación, con los polímeros conjugados con anti-Ig de caballo y rábano apropiados (Flex+, Dako). La visualización de las secciones teñidas se realizó con el cromógeno 3,3'-diaminobencidina. Todas estas tinciones se ejecutaron utilizando el autoteñidor Dako Autostainer.

Los controles negativos utilizados fueron secciones incubadas con inmunoglobulinas anti-conejo normales no inmunizadas. Para los controles positivos, se utilizaron secciones de tumores de mama con expresión conocida de las dianas moleculares a analizar. La sensibilidad para cada anticuerpo se calculó testando en un rango creciente de diluciones del anticuerpo primario. La especificidad de cada anticuerpo se confirmó en paralelo cuantificando parejas de biopsias congeladas y fijadas en bloques FFPE por la técnica de inmunodetección por western blotting, respectivamente. La preservación antigénica en los tejidos teñidos se confirmó gracias a la expresión de tirosinas fosforiladas utilizando un anticuerpo monoclonal para detectar proteínas fosforiladas en sus residuos de tirosina (clon 4G10, a dilución 1:500; Millipore).

Para hallar el porcentaje de células tumorales teñidas positivamente a diferentes intensidades (baja, media y elevada intensidad), se calculó un valor H semicuantitativo para cada tinción individual. El valor final para cada biopsia se determinó aplicando un factor de peso para cada estimación. La fórmula utilizada, con resultados entre 0 y 300, fue la siguiente:

$$\text{Valor H} = (\% \text{ bajo}) \times 1 + (\% \text{ medio}) \times 2 + (\% \text{ elevado}) \times 3$$

Los marcadores moleculares analizados en nuestro estudio con esta técnica fueron: fosfohistona H3, caspasa 3 truncada, p-PP2A, CIP2A, SET, MKP-1 y p-JNK1/2. Otros marcadores básicos en el diagnóstico del cáncer de mama se determinaron previamente a nuestro estudio como parte de la rutina de los diferentes servicios de Anatomía Patológica. En concreto, los marcadores moleculares ER (receptor de estrógenos) y PR (receptor de progesterona) se determinaron únicamente por inmunohistoquímica (clones SP1 y PgR636, respectivamente; Dako, Carpinteria, CA), con el criterio positivo establecido de >1% de la tinción nuclear del tumor [185]. La amplificación de HER-2 se realizó por la técnica de hibridación fluorescente in situ o FISH (Pathvysion; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) [186]. El marcador de proliferación Ki-67 se determinó por inmunohistoquímica (clon MIB1, Dako) [187].

3.5.5. Ensayo de actividad fosfatasa de PP2A

Se realizaron cuantificaciones de la actividad fosfatasa específica de la proteína fosfatasa PP2A. Para ello, 50 µg de extractos de proteína total se utilizaron para realizar este ensayo PP2A utilizando un kit de ensayo fosfatasa de inmunoprecipitación específico de PP2A (PP2A Immunoprecipitation Phosphatase Assay Kit, Millipore). Para inmunoprecipitar PP2A, se combinaron 4 µg de anticuerpo de PP2A y 25 mL de resina de agarosa proteína A. Tras 2 horas de incubación en balanceo, las muestras se lavaron 3 veces con tampón tris salino 1X seguido de un lavado con un tampón de ensayo serina/treonina.

A continuación, se añadieron 60 mL de fosfopéptido diluido a una concentración de 750 $\mu\text{mol/L}$ y 40 mL de tampón de ensayo serina/treonina, incubándose la mezcla durante 5 minutos a 30°C en un agitador. Posteriormente, se transfirieron 25 mL de esta mezcla incubada en pocillos de placa de 96 pocillos hasta su volumen final.

Para realizar el ensayo final, se añadieron a cada pocillo con una cuarta parte de la dilución finalmente incubada 100 mL de solución de detección verde malaquita, incubándose la placa con estas mezclas 15 minutos a temperatura ambiente. En un espectrofotómetro de placas, se cuantificó la absorbancia de las mezclas a 650 nm de longitud de onda. Los datos de absorbancia se usaron para calcular la cantidad de fosfato liberado (en pmol) utilizando una curva estándar con un rango entre 0 y 2000 pmol realizada en paralelo con un extracto de fosfato comercial de concentración conocida.

3.6. Estadística

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

Para evaluar la significancia estadística de las diferencias entre las diferentes condiciones experimentales en los experimentos *in vitro* e *in vivo* se utilizó la prueba de la T de Student para muestras pareadas. Todas las pruebas realizadas se confirmaron con un nivel de significancia de $p < 0,05$ para muestras pareadas.

En las determinaciones de las cohortes de biopsias de pacientes, se realizaron diferentes análisis relacionando las características clínicas y moleculares de los pacientes con los marcadores de interés (MKP-1, p-JNK, p-PP2A, CIP2A y SET).

La supervivencia global (OS) se definió como el tiempo desde el diagnóstico del tumor a la fecha de fallecimiento o pérdida de seguimiento. La supervivencia libre de enfermedad (DFS) se definió como el tiempo transcurrido desde el diagnóstico del tumor hasta el primer evento acontecido, considerándose como eventos posibles: recaídas en cualquier localización, muerte o pérdida de seguimiento.

Las comparaciones de supervivencia de Kaplan-Meier se realizaron con la prueba de Mantel-Cox. El modelo de riesgo proporcional de Cox se ajustó considerándose parámetros significativos en el análisis univariante. La consideración estadísticamente significativa se fijó en un valor de $p < 0,05$.

La curva de la característica operativa del receptor o curva COR se utilizó para determinar el punto de corte óptimo basado en el punto final de progresión para la expresión de MKP-1, p-JNK, p-PP2A, SET y CIP2A, tal y como describieron previamente Generali D. y colaboradores [188].

Todo el tratamiento estadístico de este trabajo se llevó a cabo de acuerdo con las guías de las recomendaciones presentadas para los estudios de marcadores tumorales pronósticos (REMARK) [189].

Finalmente, para determinar la capacidad de adición y/o sinergia entre los tratamientos de FTY720 y doxorubicina, se realizaron análisis de Chou-Talay utilizando el programa CompuSyn (ComboSyn, Inc) para hallar los valores del índice de combinación (CI). Valores de $CI < 0.90$, $0.90 < CI < 1.10$ y $CI > 1.10$ se consideraron como efectos sinérgicos, aditivos y antagonistas, respectivamente.

RESULTADOS

4.1. Los fármacos docetaxel y doxorubicina modulan la expresión de MAPK y MKP-1 en el cáncer de mama

4.1.1. Efectos en la viabilidad celular de docetaxel y doxorubicina en líneas celulares de carcinoma de mama

En las terapias adyuvantes y neoadyuvantes para tratar los diferentes subtipos de carcinomas de mama se incluyen muy frecuentemente fármacos de los grupos de las antraciclina y los taxanos. Para poder caracterizar el potencial de MKP-1 en el cáncer de mama, utilizamos líneas celulares de cáncer de mama tratadas con doxorubicina y docetaxel. Así, seleccionamos dos líneas celulares para desarrollar esta caracterización terapéutica: MDA-MB-231 (triple negativo) y BT-474 (luminal, positivo para HER2). Las características moleculares más importantes de estas líneas se detallaron en la Tabla 3.

Un estudio previo realizado por nuestro grupo demostró que el tratamiento con doxorubicina producía la inhibición de la expresión de MKP-1, con la consecuente activación de ERK1/2 y JNK1/2 [153]. En la línea celular BT-474 se utilizó el ensayo de viabilidad celular MTS a 48 horas de tratamiento para determinar la IC_{50} para doxorubicina, resultando 20 $\mu\text{mol/L}$. Para fijar una concentración efectiva pero de menor agresividad del fármaco con el mismo efecto molecular en MKP-1 y las MAPK, la concentración utilizada a la hora de tratar nuestras células de carcinoma de mama fue de 10 $\mu\text{mol/L}$ de doxorubicina durante 24 horas.

Al igual que otros taxanos, docetaxel se ha visto que produce efectos celulares de manera más tardía que las antraciclina como doxorubicina [151], por lo que decidimos calcular este valor a 24 y 72 horas de tratamiento. Para ello, realizamos triplicados de experimentos de viabilidad celular de estas células tras 24 o 72 horas de tratamiento con docetaxel en un rango de concentraciones de 5 a 500 nmol/L .

Los resultados de viabilidad celular frente a docetaxel fueron similares en las dos líneas celulares (Figura 21), tanto a 24 como a 72 horas de tratamiento. No tuvimos una desviación excesiva en ninguna de las curvas obtenidas. Para obtener los diferentes valores de IC_{50} utilizamos los valores promedios representados en la Figura 21 para realizar curvas sigmoidales dosis-respuesta de cuatro parámetros en el programa SigmaPlot. Las curvas obtenidas para docetaxel se muestran en la Figura 22. Los datos de tratamientos con docetaxel a 72 horas se ajustaron mejor a la hora de cuantificar los datos y dibujar la curva sigmoidal, con unos resultados de IC_{50} para ambas líneas celulares en torno a 10 nmol/L . En el caso de los tratamientos a 24 horas, las curvas dosis-respuesta obtenidas mostraron, en ambos casos, un valor de IC_{50} para docetaxel alrededor de 50 nmol/L .

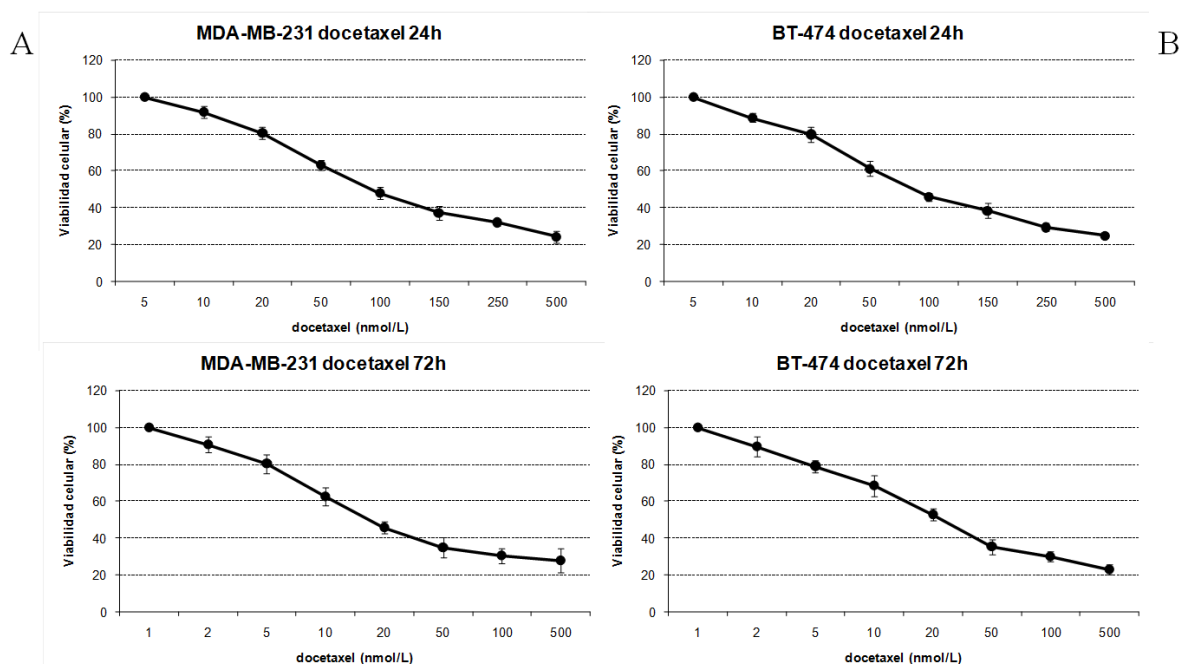


Figura 21. Viabilidad celular de células de carcinoma de mama frente a docetaxel. Cuantificación de la viabilidad celular por ensayo MTS, de células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B) frente a docetaxel, durante 24 y 72 horas. Datos representados: porcentaje relativo del promedio (medias \pm EEM de 3 experimentos) de la cuantificación del ensayo MTS a $\lambda = 460$ nm.

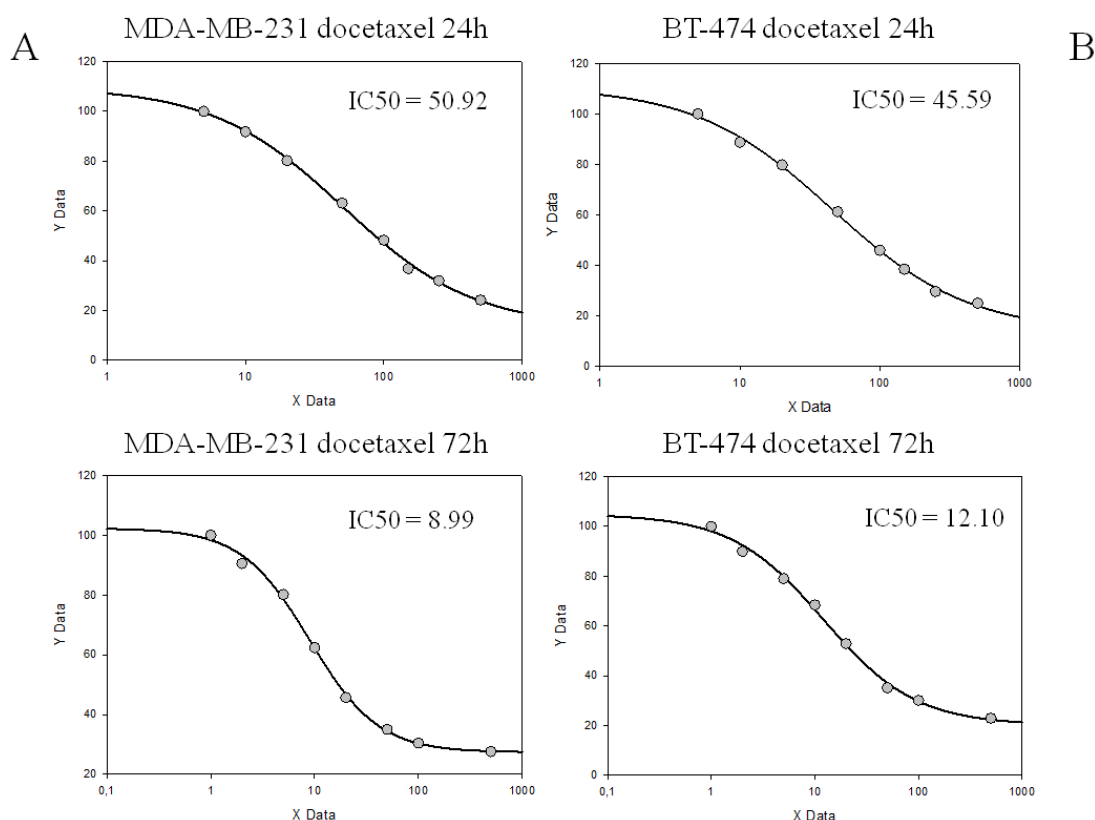


Figura 22. Valores IC_{50} de docetaxel en células de carcinoma de mama. Curvas sigmoidales dosis-respuesta de cuatro parámetros de células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B) tratadas con docetaxel durante 24 y 72 horas. X Data: concentración de docetaxel (nmol/L), en escala logarítmica; Y Data: porcentaje de viabilidad celular promedio (medias \pm EEM de 3 experimentos) tras la cuantificación del ensayo MTS.

4.1.2. Efectos moleculares de docetaxel y doxorrubicina en líneas celulares de carcinoma de mama

Para comprobar si hay vías o dianas moleculares implicadas en la respuesta celular a los tratamientos, nos planteamos cuantificar las alteraciones de la expresión génica.

Según las guías de la Red Nacional Integral del Cáncer de Estados Unidos (NCCN), mientras que los esquemas de tratamiento recomendados para los tumores de mama negativos para HER2 incluyen quimioterapia basada en antraciclinas, especialmente en neoadyuvancia [190], el régimen de quimioterapia sugerido en el caso de tratamientos de tumores HER2 positivos, en combinación con trastuzumab y/o pertuzumab, ha de contener taxanos [191]. Por ello, tratamos las células MDA-MB-231 (HER2 negativas) con doxorrubicina y las células BT-474 (HER2 positivas) con docetaxel. Se obtuvieron extractos totales de ARN de estas células y sus controles no tratados para analizar en arrays de expresión génica los cambios de expresión en el ARNm.

Los resultados de estos análisis masivos de expresión génica se muestran en las Figuras 23 y 24. Tras el tratamiento de doxorrubicina, más de 300 genes aparecieron diferencialmente alterados en células MDA-MB-231. Entre la lista de genes modulados encontramos los ARNm que codifican para las proteínas MKP-1 y MKP-2 entre los 25 genes con mayor bajada de su expresión (Figura 23A). Con respecto a las células BT-474 tratadas con docetaxel, aparecieron los genes de las proteínas MKP-1, MKP-2 y MKP-3 entre los 25 genes con mayor bajada de expresión (Figura 24A). Además, en este array de expresión génica también hubo cambios de expresión en los genes de las proteínas JNK1, JNK2 y p38 δ . Los diagramas de vías de señalización celular obtenidos de estos arrays (Figuras 23B y 24B) muestran la importancia molecular del cambio de expresión de las MKPs en estos ensayos masivos de expresión génica.

Al resultar diferencialmente expresado el ARNm de MKP-1 en ambos arrays de expresión, quisimos validar este resultado por PCR cuantitativa a tiempo real antes de continuar los tratamientos en nuestro modelo *in vitro*. Así, tratamos células MDA-MB-231 y BT-474 con 10 y 100 nmol/L de docetaxel y con 5 y 50 μ mol/L de doxorrubicina durante 24 horas, para posteriormente cuantificar su ARNm. Los resultados confirmaron el efecto inhibidor de ambos fármacos sobre la expresión de MKP-1, especialmente doxorrubicina, que redujo significativamente la expresión de este gen a las dos concentraciones utilizadas y en ambas líneas celulares (Figura 25). En el caso de docetaxel, la reducción de la expresión de MKP-1 fue significativa solo a 100 nmol/L (Figura 25).

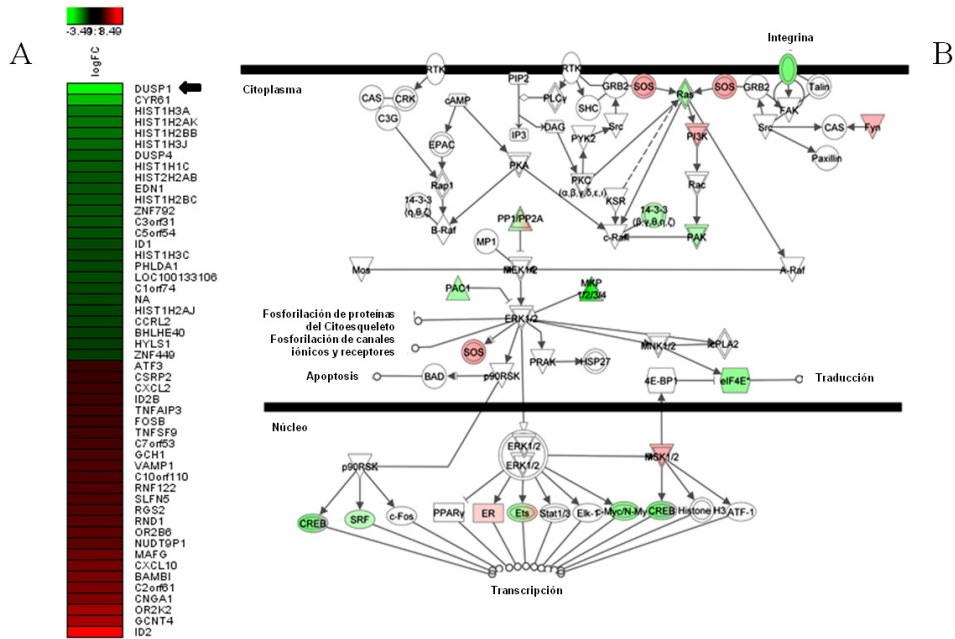


Figura 23. Perfil de microarray de expresión génica de células MDA-MB-231 tratadas con doxorubicina. A) Diagrama “heatmap” representativo de los genes diferencialmente expresados comparando las muestras tratadas versus las no tratadas, en valores de ratio de cambio o logFC. El color verde indica los 25 genes con menor expresión; el color rojo indica los 25 genes con mayor sobreexpresión. B) Diagrama de vías de señalización obtenido con los resultados del microarray de expresión génica.

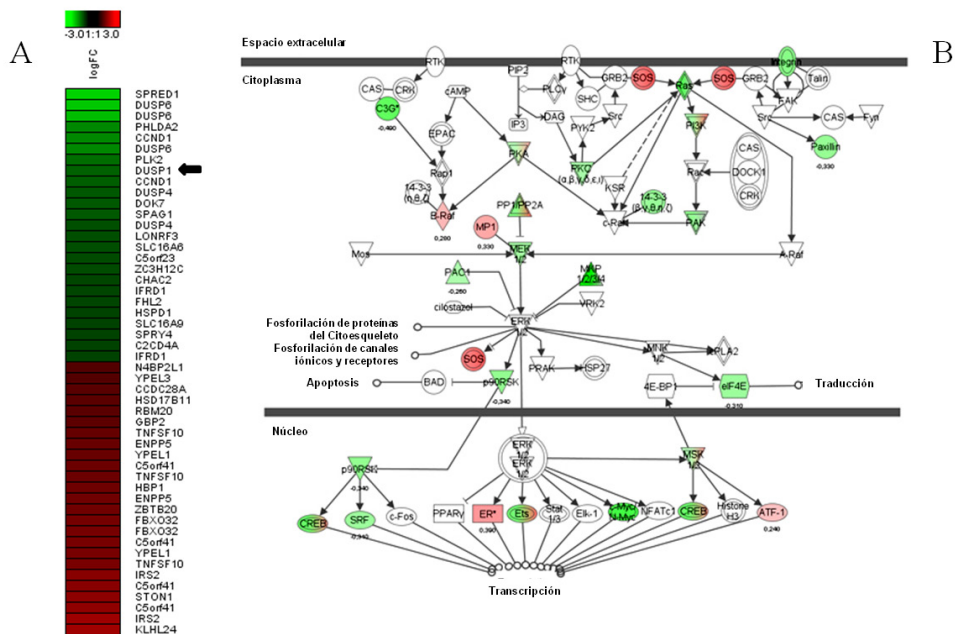


Figura 24. Perfil de microarray de expresión génica de células BT-474 tratadas con docetaxel. A) Diagrama “heatmap” representativo de los genes diferencialmente expresados comparando las muestras tratadas versus las no tratadas, en valores de ratio de cambio o logFC. El color verde indica los 25 genes con menor expresión; el color rojo indica los 25 genes con mayor sobreexpresión. B) Diagrama de vías de señalización obtenido con los resultados del microarray de expresión génica.

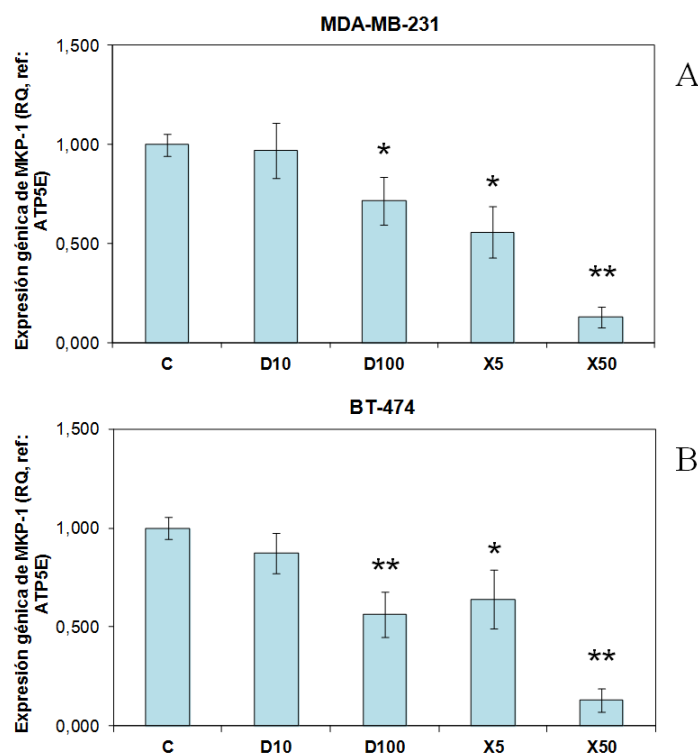


Figura 25. Cuantificación de la expresión génica, mediante PCR cuantitativa a tiempo real, del gen MKP-1 en células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B) tratadas con docetaxel (D, nmol/L) y doxorubicina (X, μ mol/L) durante 24 horas. C: vehículo. Los valores son RQ medias \pm EEM de 3 experimentos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

A continuación, cuantificamos proteínas MAPK y MKP-1 por western blotting en estas respuestas celulares a los tratamientos. Así, concluimos que tanto el tratamiento con doxorubicina (10 μ mol/L) como con docetaxel (50 nmol/L) durante 24 horas producía un aumento en la expresión de las MAPKs ERK1/2 y JNK1/2 en sus formas fosforiladas (Figura 26). Este efecto se correlacionó con una no variación de la expresión de MKP-1 en el caso de docetaxel y una reducción casi total de la expresión de la fosfatasa en las células MDA-MB-231, y total en BT-474, en el caso de doxorubicina (Figura 26).

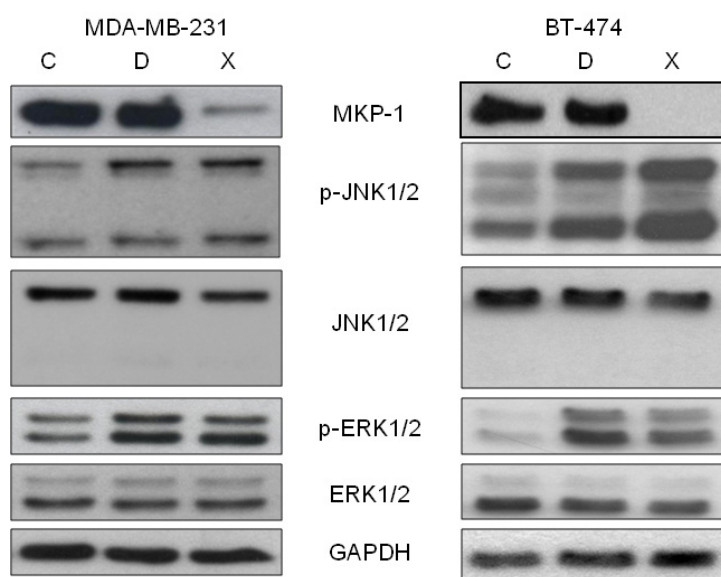


Figura 26. SDS-PAGE al 10% de acrilamida/bis-acrilamida de extractos de células MDA-MB-231 y BT-474 tratadas con 50 nmol/L de docetaxel y 10 μ mol/L de doxorubicina, durante 24 horas. Posterior inmunodetección por western blotting de MKP-1, p-ERK1/2, ERK1/2, p-JNK1/2, JNK1/2 y GAPDH (control de carga). C: vehículo; D: docetaxel; X: doxorubicina.

Finalmente, examinamos el crecimiento y la viabilidad celular para relacionarlas con los cambios de expresión de proteínas MAPKs y MKP-1 frente a estos fármacos. Así, realizamos inicialmente tratamientos a 24 horas de docetaxel y doxorubicina en ambos tipos celulares, para posteriormente teñir los pocillos con las células creciendo en monocapa, con cristal violeta. El resultado mostró una disminución significativa del crecimiento de las células en presencia de docetaxel y doxorubicina (Figura 27). BT-474 mostró un crecimiento mayor debido a su manera de ocupar el espacio en la monocapa celular en grupos de células; además, estas agrupaciones celulares protegen más las células frente a factores externos que otras líneas celulares cuyas células crecen individualizadas en monocapa (como las células MDA-MB-231). A pesar de esta diferencia, los resultados relativos en ambas líneas celulares fueron muy similares, mostrando una sensibilidad incrementada a cada fármaco a medida que aumentaba la dosis. Se confirmó una mayor agresividad de doxorubicina en comparación con docetaxel (Figura 27).

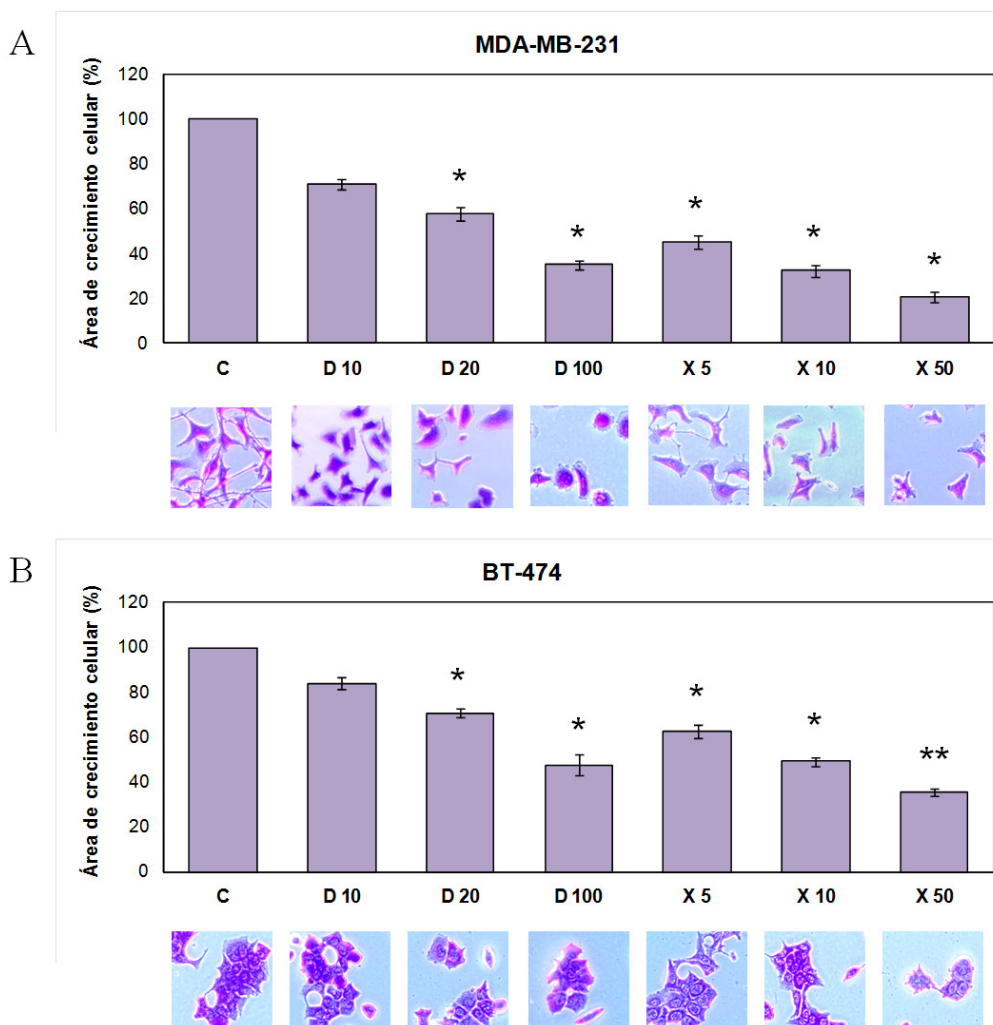


Figura 27. Crecimiento celular en presencia de los fármacos docetaxel y doxorubicina, y posterior tinción con cristal violeta, de células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B). C: vehículo D: docetaxel (nmol/L); X: doxorubicina (μmol/L). Datos representados: porcentaje relativo del promedio (medias ± EEM de 3 experimentos) del espacio celular ocupado, respecto al espacio total del área fotografiada. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

Además, se cuantificó la viabilidad celular de las células MDA-MB-231 y BT-474 frente a docetaxel y doxorubicina durante 24 horas utilizando el ensayo MTS. Los fármacos incidieron en la viabilidad celular de ambos tipos celulares de manera significativa (Figura 28). A destacar, las células BT-474 sufrieron un impacto mayor que las células MDA-MB-231.

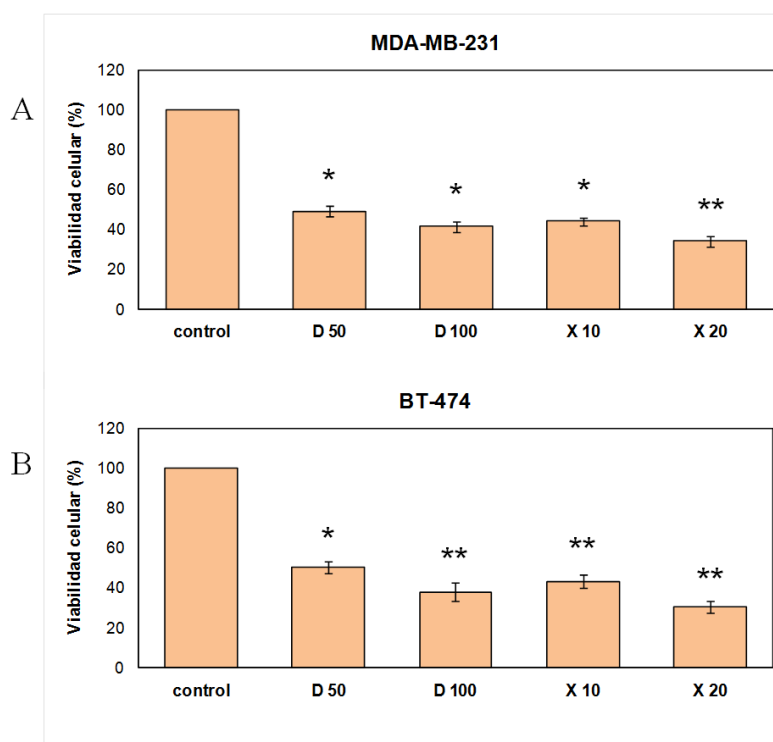


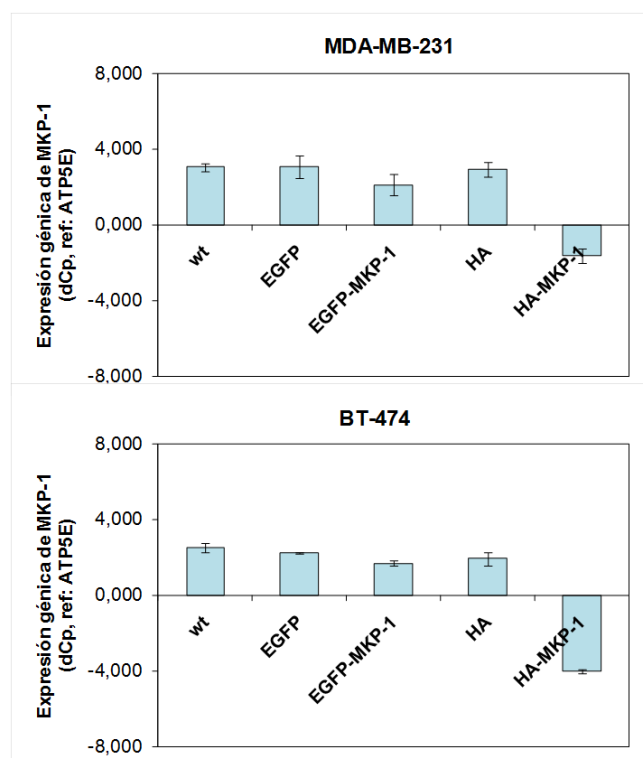
Figura 28. Viabilidad celular de las células de carcinoma de mama frente a quimioterapia. Cuantificación de la viabilidad celular por ensayo MTS, de células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B) frente a docetaxel y doxorubicina, durante 24 horas. D: docetaxel (nmol/L); X doxorubicina (μ mol/L). Datos representados: porcentaje relativo del promedio (medias \pm EEM de 3 experimentos) de la cuantificación del ensayo MTS a $\lambda = 460$ nm. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

4.1.3. Sobreexpresión de MKP-1 en líneas celulares de carcinoma de mama

Llegados a este punto de los resultados, valoramos tres hallazgos experimentales: el primero es que los tratamientos en líneas celulares con doxorubicina o docetaxel producen una alteración en la expresión génica y en la abundancia de MAPK y de MKP-1, consecuencia de una menor viabilidad celular de las mismas; el segundo es que la respuesta del cáncer de mama a doxorubicina inhibe la expresión de MKP-1, con la alteración consecuente fosforilación de proteínas MAPKs [153]; y el tercero es que, en ese mismo trabajo previo, nuestro grupo descubrió que un subgrupo de pacientes con sobreexpresión de MKP-1 no mostraban dicha modulación en respuesta a doxorubicina, lo cual se relacionaba con un peor comportamiento clínico de los pacientes [153].

En este contexto, decidimos crear un modelo de células de cáncer de mama con sobreexpresión inducida de MKP-1 para realizar la validación *in vitro* de ese supuesto subgrupo de tumores de mama en el que la sobreexpresión basal de MKP-1 alteraría la respuesta clínica a los tratamientos con quimioterapia. Para ello, utilizamos un clon de ADNc de MKP-1 insertado en el plásmido pBluescriptR (Open Biosystems, Dharmacon) para clonarlo en células eucariotas mediante un vector de transfección. Una vez ampliado y comprobado el clon, realizamos un protocolo de

digestión con enzimas de restricción, purificación, ligación en vectores de transfección y definitiva comprobación por secuenciación de las nuevas construcciones plasmídicas con la secuencia de MKP-1. Como resultado, obtuvimos dos vectores de transfección para expresar MKP-1: pCMV-HA-MKP-1 y pIRES2-EGFP-MKP-1. A continuación, realizamos experimentos de transfección de las células MDA-MB-231 y BT-474 utilizando el lípido catiónico sintético Lipofectamine 2000 (Life Technologies) en placas de 6 pocillos. Comprobamos que sólo el plásmido pCMV-HA-MKP-1 producía una verdadera sobreexpresión génica de MKP-1, tanto en MDA-MB-231 como en BT-474 (Figura 29). A pesar de numerosos ajustes del protocolo de transfección (tiempo de transfección, número de subcultivo celular...), el vector pIRES2-EGFP-MKP-1 no fue útil a la hora de sobreexpresar el gen de MKP-1 en esas células de mama.



A

Figura 29. Cuantificación de la expresión génica, mediante PCR cuantitativa a tiempo real, del gen MKP-1 en células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B) transfectadas con los plásmidos pIRES2-EGFP-MKP-1 y pCMV-HA-MKP-1 (y sus respectivos controles vacíos). wt: células control sin transfectar. Los valores son dCp medias \pm EEM de 3 experimentos.

B

4.1.4. Sobreexpresión de MKP-1 y quimiorresistencia a docetaxel y doxorubicina

Una vez sobreexpresada MKP-1 en las células de carcinoma de mama, realizamos tratamientos de dichas células con docetaxel y doxorubicina para investigar la capacidad de supervivencia celular y las alteraciones de las proteínas MAPKs ERK1/2 y JNK1/2. A nivel de expresión génica, la sobreexpresión de MKP-1 se produjo a niveles muy similares, independientemente del tratamiento (Figura 30). Como se puede observar en el western blotting de MKP-1 (Figura 31A), la forma sobreexpresada de MKP-1 se diferencia entre 6 y 8 kDa de tamaño de la forma endógena de la proteína (de tamaño estimado en 40 kDa). Esto se debe a que el plásmido pCMV-HA-MKP-1 se traduce como un complejo de fusión entre MKP-1 y la cola de hemaglutinina. Además, podemos apreciar que, tanto en MDA-MB-231 como en BT-474, la banda

correspondiente a la forma endógena de MKP-1 desaparece tras el tratamiento de 24 horas con doxorubicina. Sin embargo, mientras que la banda correspondiente a la forma sobreexpresada de la proteína fosfatasa sí desaparece en BT-474, no ocurre así en las células MDA-MB-231. En cuanto al efecto de docetaxel, no se apreciaron diferencias en los niveles de abundancia de MKP-1 entre las células sobreexpresadas y las células control, en ninguna de las dos líneas celulares (Figura 31A). La fosforilación de ERK1/2 no pareció alterarse por la sobreexpresión de MKP-1, pero sí la de JNK1/2, que bajó claramente en ambas líneas celulares (Figura 31B). Por el contrario, los tratamientos aumentaron la forma fosforilada de JNK1/2, aunque en un grado considerablemente menor que en la condición control, en las células BT-474 y sobre todo en MDA-MB-231 (Figura 31B). Así, concluimos que la sobreexpresión de MKP-1 impactó en la activación de JNK1/2, pero no en la de ERK1/2, en ambas líneas celulares.

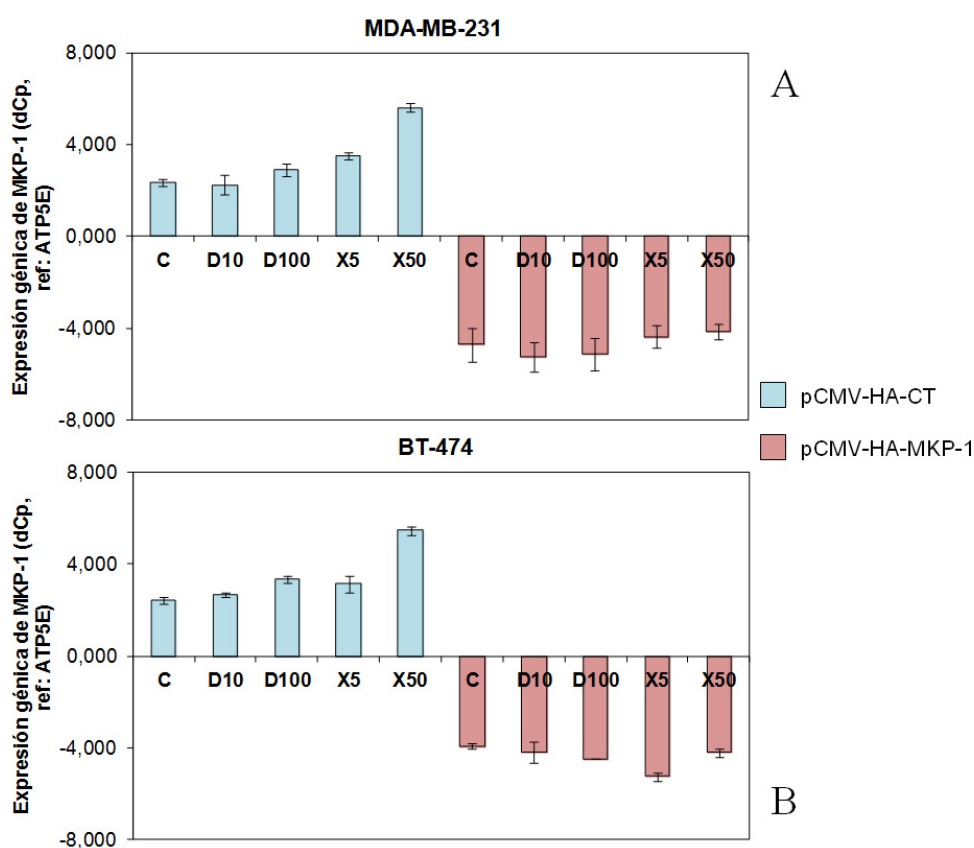


Figura 30. Cuantificación de la expresión génica, mediante PCR cuantitativa a tiempo real, del gen MKP-1 en células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B) transfectadas con los plásmidos pCMV-HA-CT (control vacío) y pCMV-HA-MKP-1; y tratadas con docetaxel (D, nmol/L) y doxorubicina (X, μ mol/L) durante 24 horas. C: vehículo. Los valores son dCp medias \pm EEM de 3 experimentos.

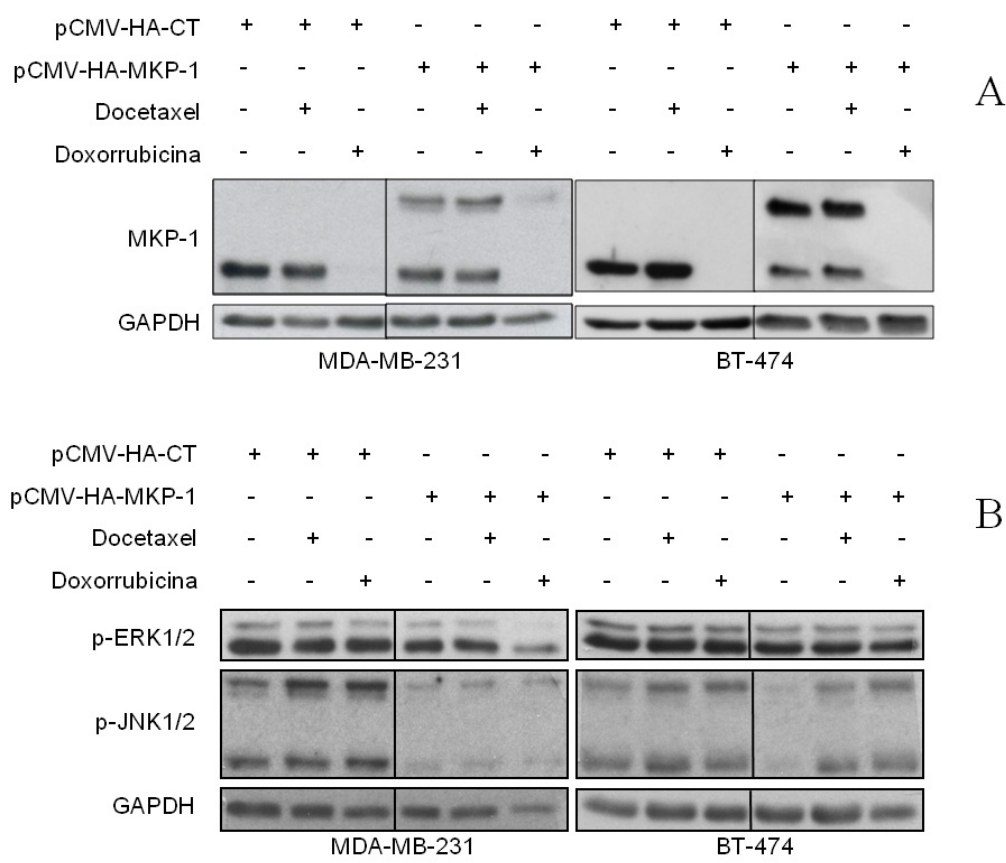


Figura 31. SDS-PAGE al 10% de acrilamida/bis-acrilamida de extractos de células MDA-MB-231 y BT-474 tratadas con sobreexpresión de MKP-1 y tratadas con 50 nmol/L de docetaxel y 10 μ mol/L de doxorrubicina, durante 24 horas. Posterior inmunodetección por western blotting de MKP-1 (A), p-ERK1/2, p-JNK1/2 (B) y GAPDH (control de carga). pCMV-HA-CT: plásmido vacío control. pCMV-HA-MKP-1: plásmido con gen para MKP-1.

Para comprobar la capacidad de supervivencia celular frente a los agentes quimioterápicos, cuantificamos el crecimiento celular en placa, la viabilidad celular y la apoptosis. Las Figuras 32 y 33 muestran los resultados de cuantificación de células teñidas con cristal violeta tras la transfección con pCMV-HA-MKP-1 y los tratamientos con docetaxel y doxorrubicina. Las células MDA-MB-231 con sobreexpresión de MKP-1 mostraron una mayor capacidad de crecimiento en presencia de los fármacos (Figura 32), con diferencias significativas para casi todas las concentraciones de tratamiento ensayadas (especialmente, en los casos de tratamiento con doxorrubicina). Algo similar ocurrió con las células BT-474 transfectadas, aunque debido a su tipo de crecimiento en forma de agrupaciones de células, las diferencias cuantificadas con esta técnica fueron menos llamativas (Figura 33). De esta forma, demostramos que la sobreexpresión de MKP-1 en ambas líneas celulares aumentaba la supervivencia celular frente a los tratamientos.

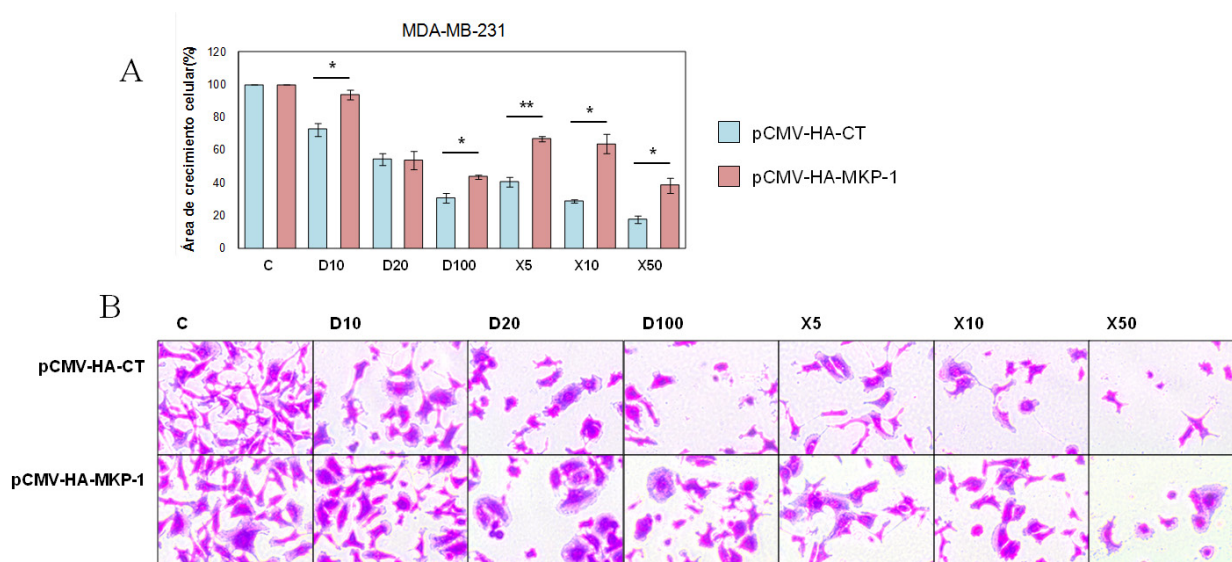


Figura 32. Crecimiento celular en presencia de los fármacos docetaxel y doxorubicina, y posterior tinción con cristal violeta, de células MDA-MB-231 sobreexpresando MKP-1. A) porcentaje relativo del promedio (medias \pm EEM de 3 experimentos) del espacio celular ocupado, respecto al espacio total del área fotografiada. B) Detalle de fotos del experimento de cuantificación de las células teñidas con cristal violeta. D: docetaxel (nmol/L); X: doxorubicina (μ mol/L); pCMV-HA-CT: plásmido vacío control. pCMV-HA-MKP-1: plásmido con gen para MKP-1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

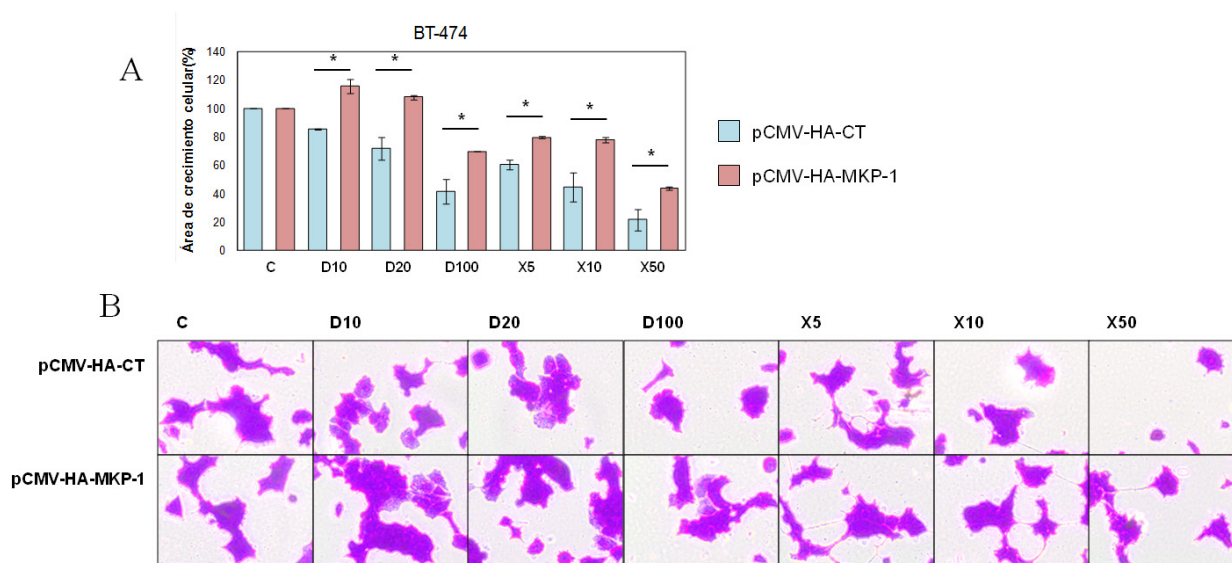


Figura 33. Crecimiento celular en presencia de los fármacos docetaxel y doxorubicina, y posterior tinción con cristal violeta, de células BT-474 sobreexpresando MKP-1. A) porcentaje relativo del promedio (medias \pm EEM de 3 experimentos) del espacio celular ocupado, respecto al espacio total del área fotografiada. B) Detalle de fotos del experimento de cuantificación de las células teñidas con cristal violeta. D: docetaxel (nmol/L); X: doxorubicina (μ mol/L); pCMV-HA-CT: plásmido vacío control. pCMV-HA-MKP-1: plásmido con gen para MKP-1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

Los resultados de viabilidad celular determinados por MTS frente a los fármacos en las células de carcinoma de mama sobreexpresando MKP-1 confirmaron los anteriores (Figura 34). Así, la introducción de la construcción exógena de la proteína MKP-1 incrementó la resistencia de las dos líneas celulares tanto a docetaxel como a doxorubicina.

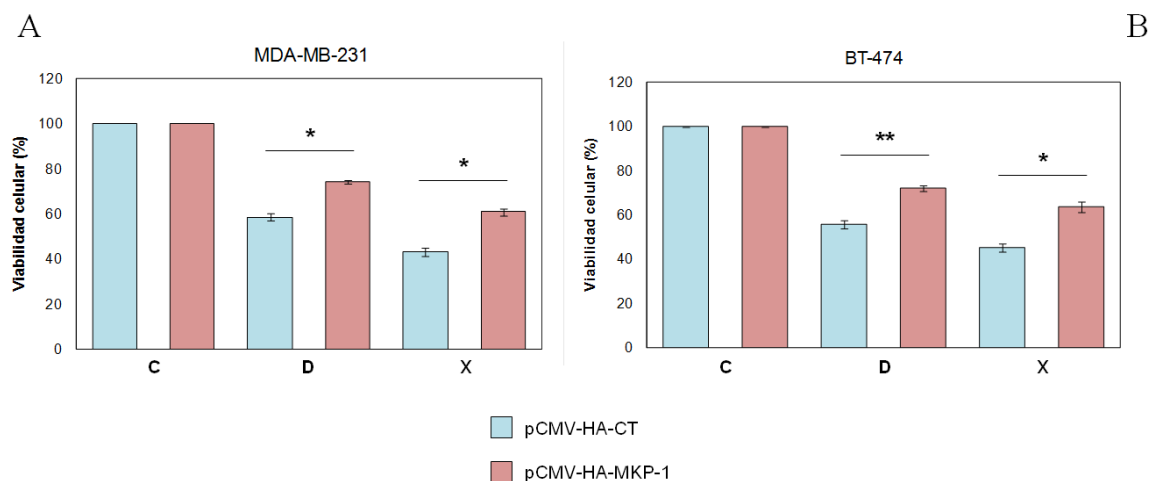


Figura 34. Viabilidad celular de las células de carcinoma de mama sobreexpresando MKP-1, frente a quimioterapia. Cuantificación de la viabilidad celular por ensayo MTS, de células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B) frente a docetaxel y doxorubicina, durante 24 horas. C: vehículo; D: 50 nmol/L de docetaxel; X: 10 µmol/L de doxorubicina. Datos representados: porcentaje relativo del promedio (medias ± EEM de 3 experimentos) de la cuantificación del ensayo MTS a $\lambda = 460$ nm. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

Finalmente, la determinación de la apoptosis se realizó con anexina V e ioduro de propidio y la cuantificación de las células positivas en un citómetro de flujo (Figura 35). De forma general, la sobreexpresión de MKP-1 redujo la apoptosis provocada por los tratamientos. Doxorubicina fue más determinante a la hora de producir apoptosis, aunque esta sobreexpresión exógena de MKP-1 redujo significativamente este efecto en ambas líneas celulares. En el caso de los tratamientos con docetaxel, la reducción sólo fue significativa en las células MDA-MB-231.

En resumen, estos resultados demostraron que la sobreexpresión de MKP-1 inducida en las células MDA-MB-231 y BT-474 incrementó la resistencia a la quimioterapia frente a las células parentales y que la inhibición de la fosforilación de JNK1/2 podría estar jugando un papel molecular crucial en esta mayor capacidad de supervivencia celular.

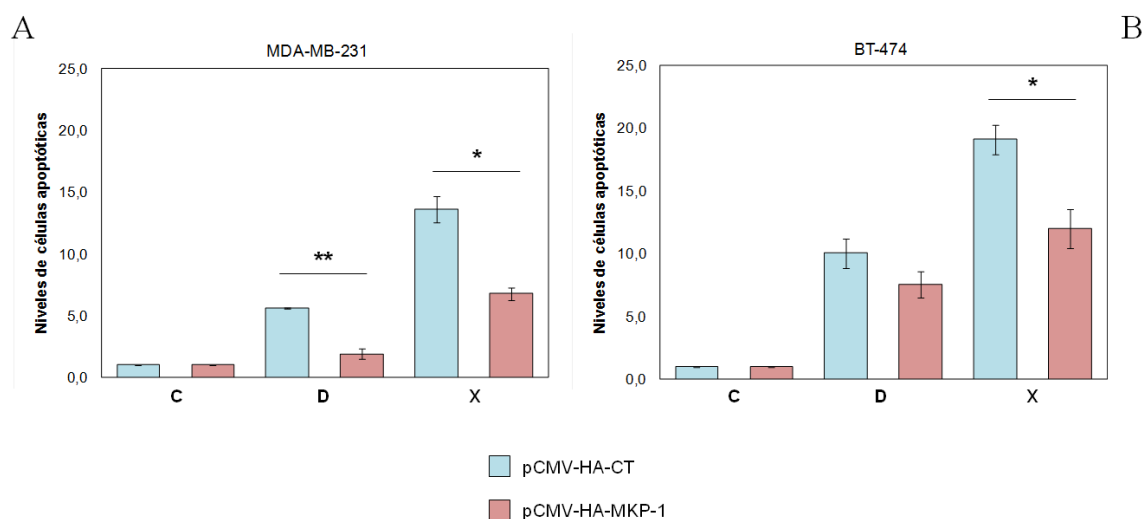


Figura 35. Número de células apoptóticas (detección de células teñidas con anexina V e ioduro de propidio; material y métodos) tras la sobreexpresión de MKP-1 y 24 horas de tratamiento con quimioterapia, en células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B). Datos representados son medias \pm EEM de 3 experimentos. C: vehículo; D: 50 nmol/L de docetaxel; X: 10 μ mol/L de doxorubicina. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

4.1.5. JNK1/2 es el mediador de la quimiorresistencia *in vitro* a docetaxel y doxorubicina inducida por la sobreexpresión de MKP-1 en el cáncer de mama

Con el fin de profundizar más en este mecanismo molecular, decidimos modular específicamente tanto la fosforilación de JNK1/2 como la activación de MKP-1 en nuestro modelo experimental. Para ello, utilizamos tres agentes químicos: anisomicina, que fomenta la fosforilación de JNK1/2; SP6000125, que inhibe la fosforilación de JNK1/2; y Ro-31-8220, que inhibe MKP-1. Para ello, ajustamos las condiciones de estos agentes en nuestro modelo *in vitro* (Figura 36). Posteriormente, hicimos experimentos de tratamientos con los quimioterápicos tras la acción de los agentes moduladores testados con idea de identificar posibles interacciones negativas entre ellos que alteraran el modelo experimental. Afortunadamente, no hubo ningún resultado que nos hiciese dudar sobre el esperable efecto de los agentes quimioterápicos en nuestro modelo celular (Figura 37).

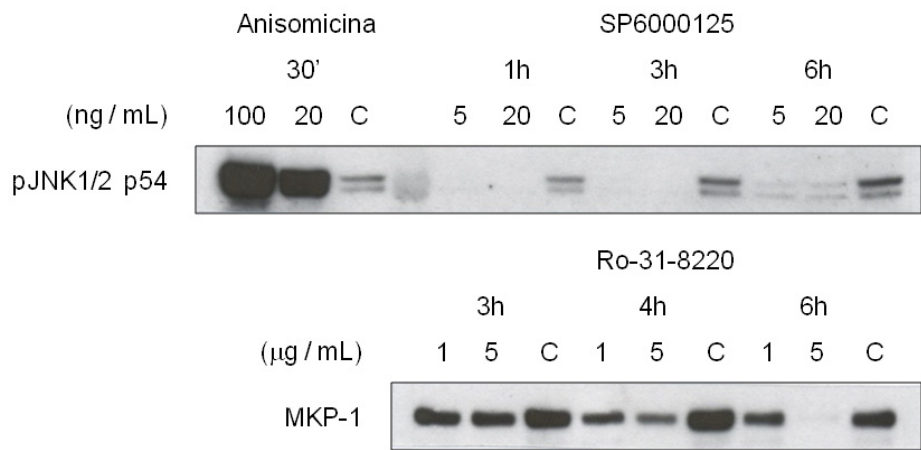


Figura 36. SDS-PAGE al 10% de acrilamida/bis-acrilamida de extractos de células MDA-MB-231 en presencia de los agentes anisomicina, SP6000125 y Ro-31-8220, a diferentes concentraciones y tiempos. Posterior inmunodetección por western blotting de MKP-1 y pJNK1/2. C: vehículo.

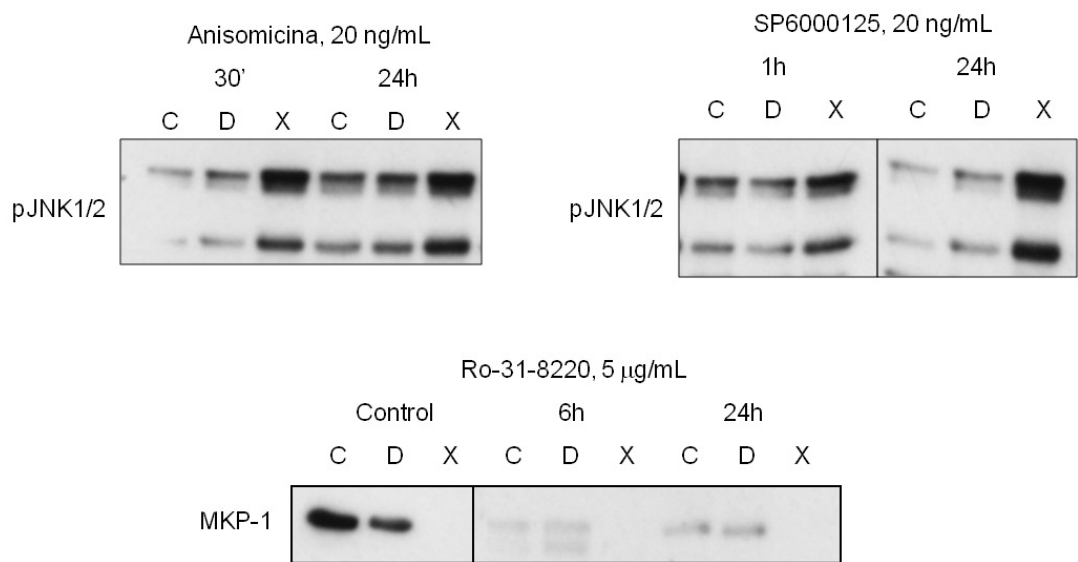


Figura 37. SDS-PAGE al 10% de acrilamida/bis-acrilamida de extractos de células MDA-MB-231 en presencia de los agentes anisomicina, SP6000125 y Ro-31-8220, a diferentes concentraciones y tiempos; y posterior tratamiento con docetaxel (D; 50 nmol/L) y doxorubicina (X; 10 µmol/L) durante 24 horas. Inmunodetección por western blotting de MKP-1 y pJNK1/2. C: vehículo.

Una vez fijadas las condiciones de concentración, analizamos el efecto de docetaxel y doxorubicina (Figuras 38 y 39). En general, el efecto de la sobreexpresión de MKP-1 resultó superior a la modulación por los agentes activadores o inhibidores de la ruta. En ambas líneas celulares, la sobreexpresión de MKP-1 inhibió la capacidad de anisomicina para activar JNK1/2. Además, la mayor expresión de MKP-1 sumó su efecto inhibitor de JNK1/2 al de SP6000125 (Figura 38). Sin embargo, Ro-31-8220 no consiguió inhibir la sobreexpresión de MKP-1 en las células transfectadas (Figura 39). En relación a los quimioterápicos, docetaxel no fue capaz de activar JNK1/2 en las células transfectadas, ni siquiera con la acción previa de anisomicina (Figura 38). Sin embargo,

doxorrubicina consiguió activar JNK1/2 con la acción previa del agente anisomicina en las células MDA-MB-231 pero no en BT-474 (Figura 38), además de inhibir con algo más de intensidad la expresión exógena de MKP-1 cuando previamente había actuado el agente Ro-31-8220 (Figura 39). Todos estos resultados proporcionaron solidez a la teoría de que la sobreexpresión de MKP-1 en nuestro modelo *in vitro* de cáncer de mama inhibe significativamente la activación de JNK1/2.

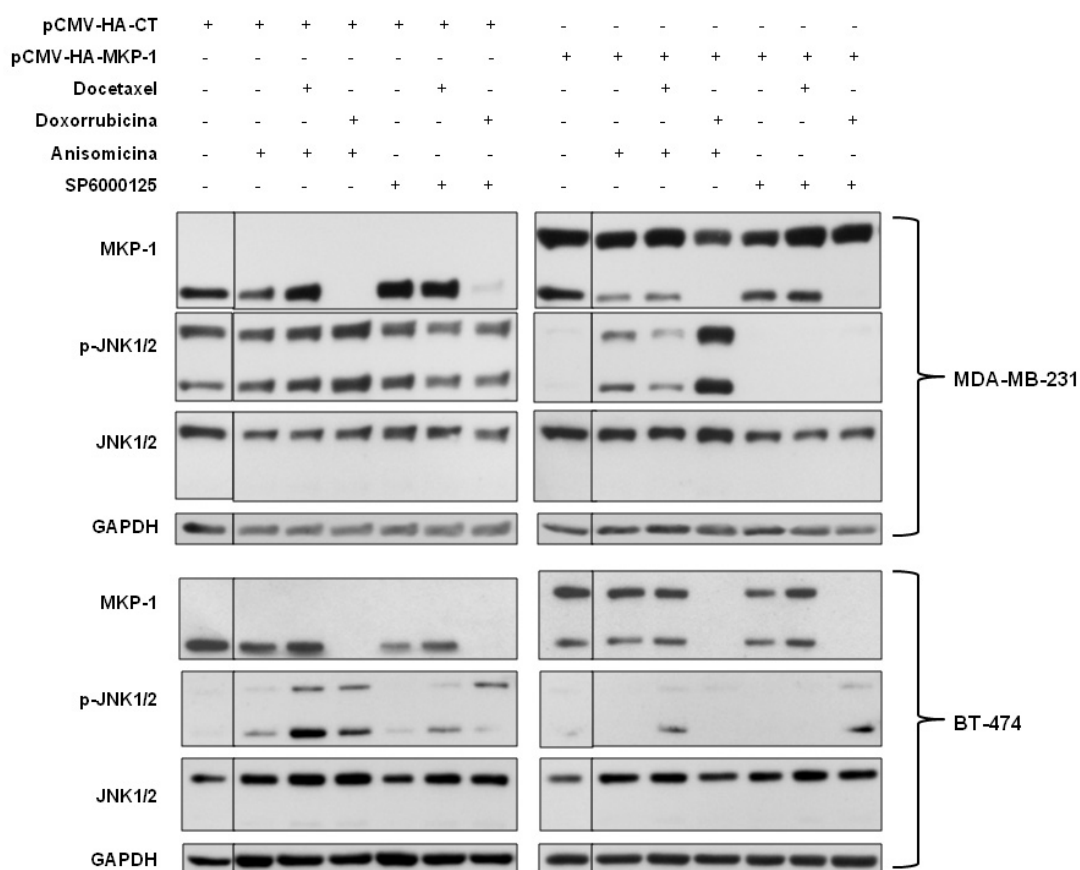


Figura 38. SDS-PAGE al 10% de acrilamida/bis-acrilamida de extractos de células MDA-MB-231 y BT-474 parentales y sobreexpresando MKP-1; tras el crecimiento en presencia de los agentes anisomicina (20 ng/mL) y SP6000125 (20 ng/mL); y el tratamiento con docetaxel 50 nmol/L y doxorrubicina 10 μ mol/L, durante 24 horas. Posterior inmunodetección por western blotting de MKP-1, p-JNK1/2, JNK1/2 y GAPDH (control de carga). pCMV-HA-CT: vector vacío. pCMV-HA-MKP-1: vector de expresión de MKP-1.

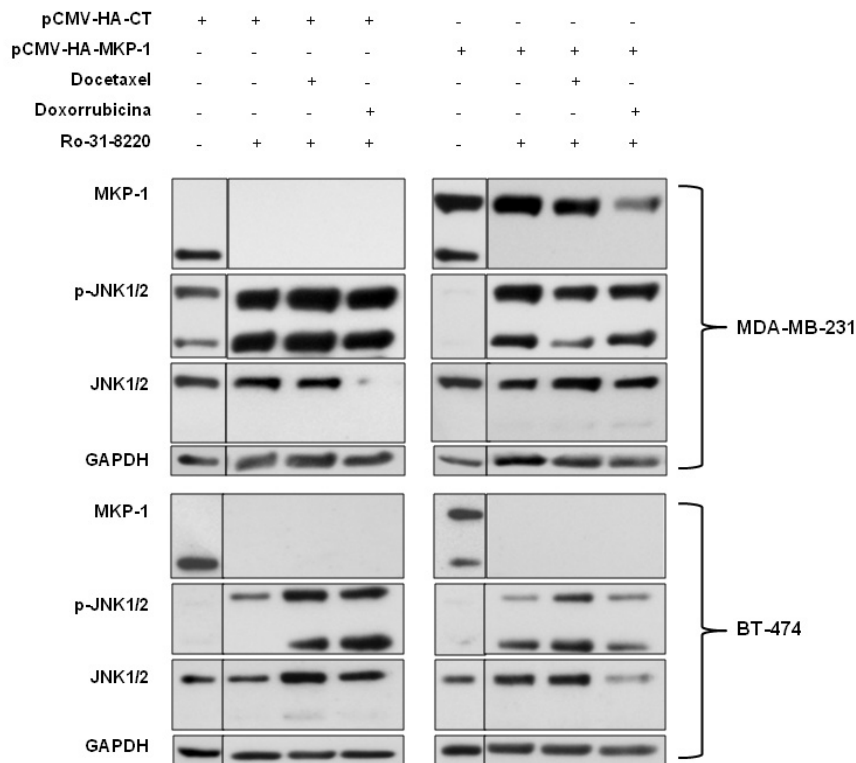


Figura 39. SDS-PAGE al 10% de acrilamida/bis-acrilamida de extractos de células MDA-MB-231 y BT-474 parentales y sobreexpresando MKP-1; tras el crecimiento en presencia del agente Ro-31-8220 (5 µg/mL); y el tratamiento con docetaxel 50 nmol/L y doxorrubicina 10 µmol/L, durante 24 horas. Posterior inmunodetección por western blotting de MKP-1, p-JNK1/2, JNK1/2 y GAPDH (control de carga). pCMV-HA-CT: vector vacío. pCMV-HA-MKP-1: vector de expresión de MKP-1.

Cuando cuantificamos la viabilidad celular con el ensayo MTS, el efecto antiproliferativo de docetaxel y doxorrubicina se favorecía en las células parentales con previo tratamiento de anisomicina (Figura 40). Al contrario, ambos fármacos no actuaron con efectividad a la hora de disminuir la viabilidad celular de las células parentales en presencia de SP6000125, en ambos tipos celulares (Figura 40). En comparación, las células transfectadas mostraron mayor viabilidad que las células control, ya fuesen previamente crecidas en presencia de anisomicina o de SP6000125 (Figura 40). De esta forma, el efecto proliferativo que aportó MKP-1 en MDA-MB-231 y BT-474 superaba cualquier modulación ejercida por estos agentes.

Por otra parte, las células con sobreexpresión de MKP-1 resultaron menos apoptóticas que las parentales cuando se trataban con docetaxel o doxorrubicina (Figura 41). Sin embargo, estas células con sobreexpresión de MKP-1 presentaron un nivel de apoptosis similar al control inicial en presencia de anisomicina previa al tratamiento con quimioterapia. Además, las células control previamente crecidas en presencia de SP6000125 aumentaron su supervivencia frente a los valores cuantificados en las células transfectadas y tratadas.

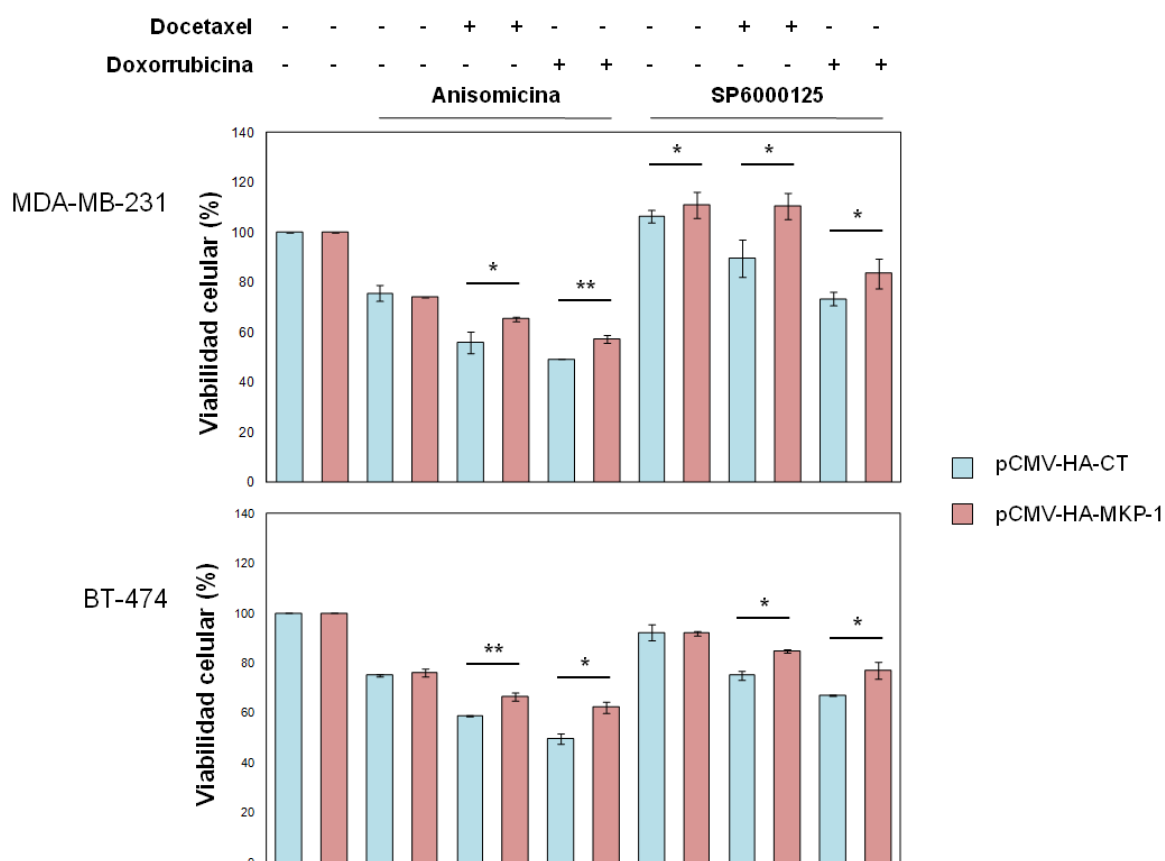


Figura 40. Cuantificación de la viabilidad celular por ensayo MTS, de células MDA-MB-231 y BT-474 parentales y sobreexpresando MKP-1; tras el crecimiento en presencia de los agentes anisomicina (20 ng/mL) y SP6000125 (20 ng/mL); y el tratamiento con docetaxel 50 nmol/L y doxorubicina 10 μ mol/L, durante 24 horas. Datos representados: porcentaje relativo del promedio (medias \pm EEM de 3 experimentos) de la cuantificación del ensayo MTS a $\lambda = 460$ nm. pCMV-HA-CT: vector vacío. pCMV-HA-MKP-1: vector de expresión de MKP-1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

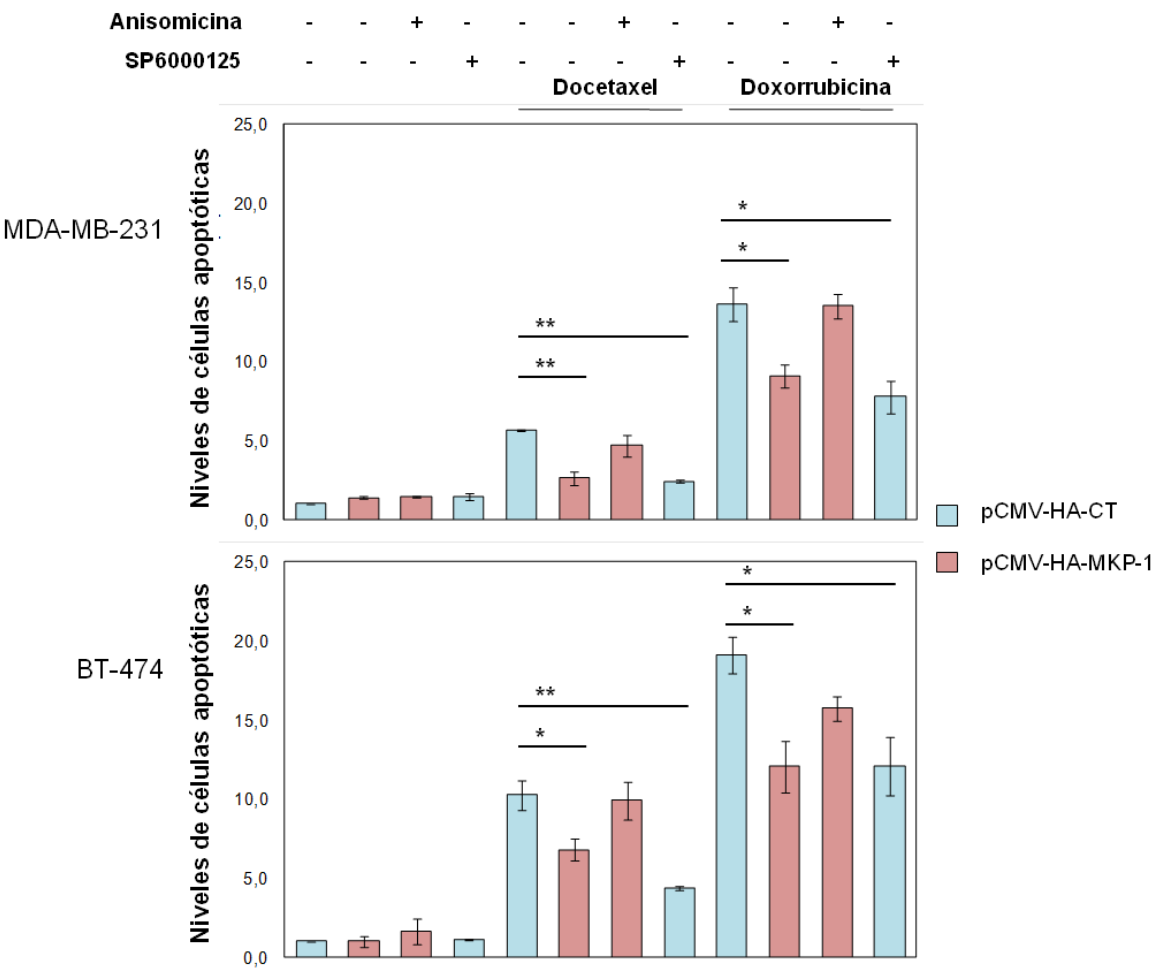


Figura 41. Número de células apoptóticas (detección de células teñidas con anexina V e ioduro de propidio; material y métodos) tras la sobreexpresión de MKP-1; el crecimiento en presencia de los agentes anisomicina (20 ng/mL) y SP6000125 (20 ng/mL); y el tratamiento con quimioterapia durante 24 horas, en células MDA-MB-231 y BT-474. Datos representados son medias \pm EEM de 3 experimentos. C: vehículo; D: 50 nmol/L de docetaxel; X: 10 μ mol/L de doxorubicina. pCMV-HA-CT: vector vacío. pCMV-HA-MKP-1: vector de expresión de MKP-1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

A la vista de todos estos resultados, comprobamos cómo la sobreexpresión de MKP-1 en líneas celulares de cáncer de mama inhibió la activación de JNK1/2 lo suficiente como para favorecer la supervivencia celular. Sin embargo, este efecto protumoral fue susceptible de ser modulado *in vitro* mediante inhibidores químicos de la vía de las MAPK.

4.2. Significado clínico de MKP-1 en el cáncer de mama

4.2.1. Valor clínico de la expresión de MKP-1 en el cáncer de mama precoz tratado en adyuvancia con quimioterapia

Tras los resultados obtenidos *in vitro*, seleccionamos un grupo multicéntrico de biopsias de pacientes con carcinoma de mama precoz, para cuantificar la expresión de MKP-1 y JNK1/2 fosforilado mediante inmunohistoquímica. Esta cohorte clínica se compuso de 350 muestras de carcinoma de mama precoz tratados mayoritariamente con terapia adyuvante basada en antraciclinas. Las características clínicas y moleculares de estas pacientes están detalladas en la Tabla 4.

Tabla 4. Características clínicas y moleculares de una cohorte de 350 pacientes con carcinoma de mama precoz.

		No.	(%)
Edad			
	58 (27-89)		
T			
	1	189	(54,0)
	2	126	(36,0)
	3	33	(9,4)
	4	2	(0,6)
N			
	0	203	(58,0)
	1	87	(24,9)
	2	38	(10,9)
	3	22	(6,3)
Grado			
	1	52	(14,9)
	2	163	(46,6)
	3	135	(38,6)
ER			
	Negativo	101	(28,9)
	Positivo	249	(71,1)
PR			
	Negativo	134	(38,3)
	Positivo	216	(61,7)
HER2			
	Negativo	271	(77,4)
	Positivo	79	(22,6)
Subtipo molecular St Gallen			
	Luminal A	162	(46,3)
	Luminal B HER2-	42	(12,0)
	Luminal B HER2+	53	(15,1)
	HER2	26	(7,4)
	Triple Negativo	67	(19,2)
Recaída			
	No	277	(79,1)
	Si	73	(20,9)
Ki-67			
	Bajo	241	(68,9)
	Alto	109	(31,1)

Como se puede observar en la Figura 42, la expresión tanto de MKP-1 como de JNK1/2 se localizó principalmente en los núcleos de las células tumorales, con una distribución diseminada por toda la zona tumoral. En zonas del epitelio normal y células estromales los niveles de expresión de ambas dianas fueron muy débiles.

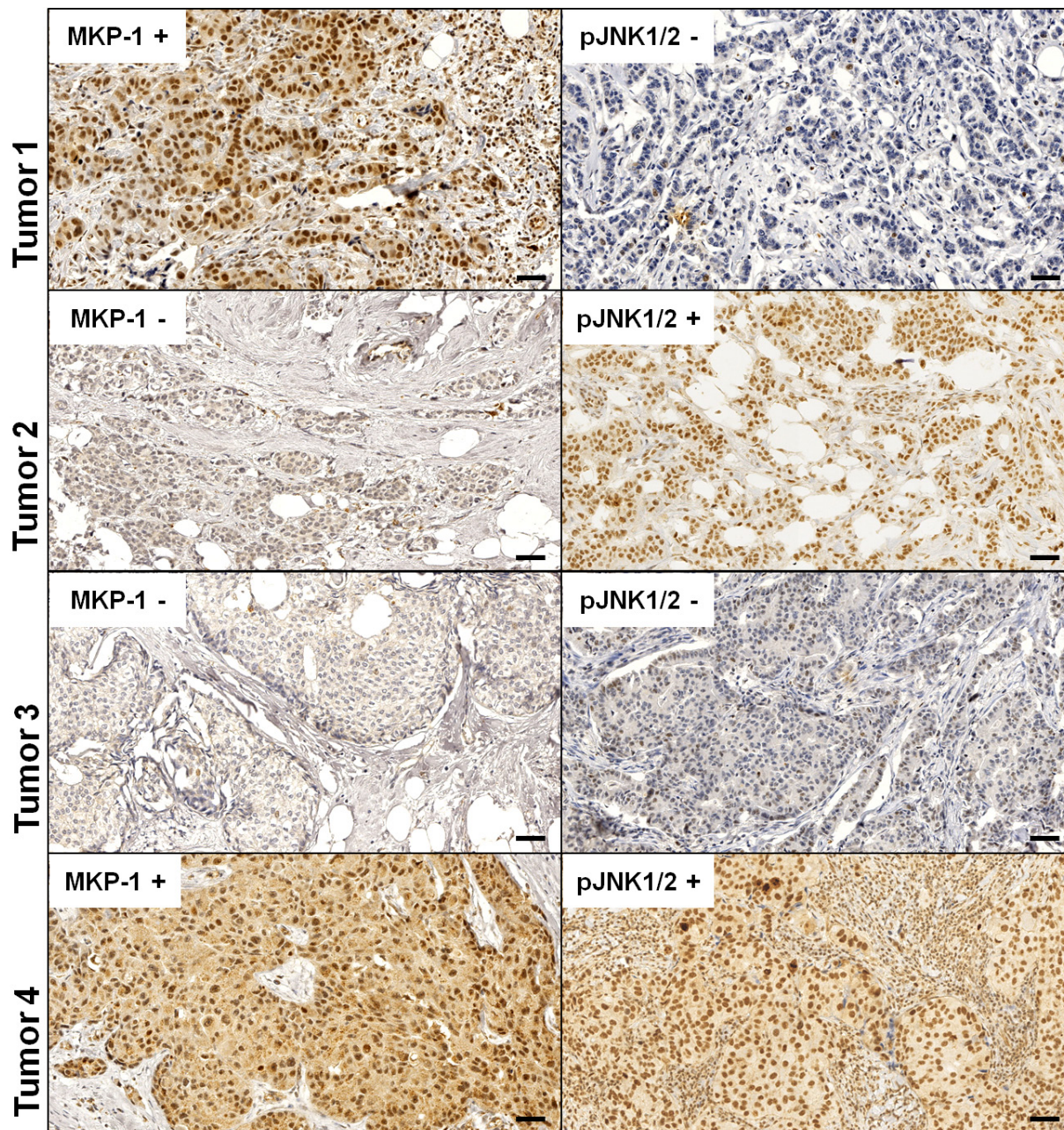


Figura 42. Determinación de la expresión de MKP-1 en carcinoma de mama. Panel ejemplar de la detección inmunohistoquímica de MKP-1 y p-JNK1/2 en biopsias de carcinoma de mama, mostrándose la expresión positiva y negativa de cada proteína. La línea de referencia muestra 30 μ m y el aumento es de 200x.

Estas determinaciones mostraron unos niveles elevados de MKP-1 en el 31% de los tumores (109/350). El 80% de estas biopsias expresaron unos niveles muy bajos de la forma fosforilada de JNK1/2 (87/109). En comparación con otros parámetros registrados, la elevada expresión de MKP-1 se asociaba con el tamaño tumoral ($p = 0,013$) y con la recaída ($p < 0,001$). Finalmente, los elevados niveles de expresión de MKP-1 no se asociaron con el subtipo biológico, por lo que descartamos la influencia de este evento molecular en la clasificación molecular actualmente aceptada. La totalidad de las comparaciones estadísticas realizadas a esta cohorte clínica de tumores mamarios frente a la expresión de MKP-1 y p-JNK1/2 están recogidas en la Tabla 5.

Tabla 5. Correlación de la expresión de MKP-1 y p-JNK1/2 con los parámetros moleculares y clínicos en la cohorte de 350 pacientes de carcinoma de mama. ER: receptor de estrógenos; PR: receptor de progesterona.

	No. Casos	No. MKP-1 - (%)	No. MKP-1 + / pJNK + (%)	No. MKP-1 + / pJNK - (%)	p
Expresión de MKP-1/p-JNK	350	241 (68,9)	22 (6,3)	87 (24,9)	
T	350	241	22	87	0,013
1	189	143 (59,3)	9 (40,9)	37 (42,5)	
2	126	81 (33,6)	10 (45,5)	35 (40,2)	
3	33	17 (7,1)	3 (13,6)	13 (14,9)	
4	2	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (2,3)	
N	350	241	22	87	0,147
0	203	149 (61,8)	10 (45,5)	44 (50,6)	
1	87	57 (23,7)	8 (36,4)	22 (25,3)	
2	38	25 (10,4)	2 (9,1)	11 (12,6)	
3	22	10 (4,1)	2 (9,1)	10 (11,5)	
Grado	350	241	22	87	0,880
1	52	35 (14,5)	2 (9,1)	15 (17,2)	
2	163	111 (46,1)	11 (50,0)	41 (47,1)	
3	135	95 (39,4)	9 (40,9)	31 (35,6)	
ER	350	241	22	87	0,911
Negativo	101	68 (28,2)	7 (31,8)	26 (29,9)	
Positivo	249	173 (71,8)	15 (68,2)	61 (70,1)	
PR	350	241	22	87	0,767
Negativo	134	92 (38,2)	7 (31,8)	35 (40,2)	
Positivo	216	149 (61,8)	15 (68,2)	52 (59,8)	
HER2	350	241	22	87	0,919
Negativo	271	188 (78,0)	17 (77,3)	66 (75,9)	
Positivo	79	53 (22,0)	5 (22,7)	21 (24,1)	
Subtipo molecular St Gallen	350	241	22	87	0,400
Luminal A	162	119 (49,4)	6 (27,3)	37 (42,5)	
Luminal B HER2-	42	25 (10,4)	6 (27,3)	11 (12,6)	
Luminal B HER2+	53	35 (14,5)	4 (18,2)	14 (16,1)	
HER2	26	18 (7,4)	1 (4,5)	7 (8,0)	
Triple negative	67	44 (18,3)	5 (22,7)	18 (20,7)	
Recaída	350	241	22	87	<0,001
No	277	234 (97,1)	9 (40,9)	34 (39,1)	
Si	73	7 (2,9)	13 (59,1)	53 (60,9)	
Ki-67	350	241	22	87	0,140
Bajo	241	169 (70,1)	11 (50,0)	61 (70,1)	
Alto	109	72 (29,9)	11 (50,0)	26 (29,9)	

La comparación de los eventos moleculares “abundancia de MKP-1” y “fosforilación de JNK1/2” con los datos de seguimiento clínico expuso que entre todas las pacientes de nuestro grupo clínico de estudio, el subgrupo de tumores con elevada expresión de MKP-1 mostraba una supervivencia clínica significativamente menor tras la quimioterapia adyuvante posterior a la biopsia, ya fuese comparando esta determinación molecular con la supervivencia global ($p < 0,001$) o con la supervivencia libre de enfermedad ($p < 0,001$) (Figura 43). Además, se encontró un subgrupo con peores curvas de supervivencia: los tumores con menor fosforilación de JNK1/2 (Figura 43). En este sentido, el resultado de asociación con las pacientes recaídas anteriormente mencionado refuerza notablemente la determinación molecular de la expresión de MKP-1 y p-JNK1/2 en estas pacientes de carcinoma de mama precoz.

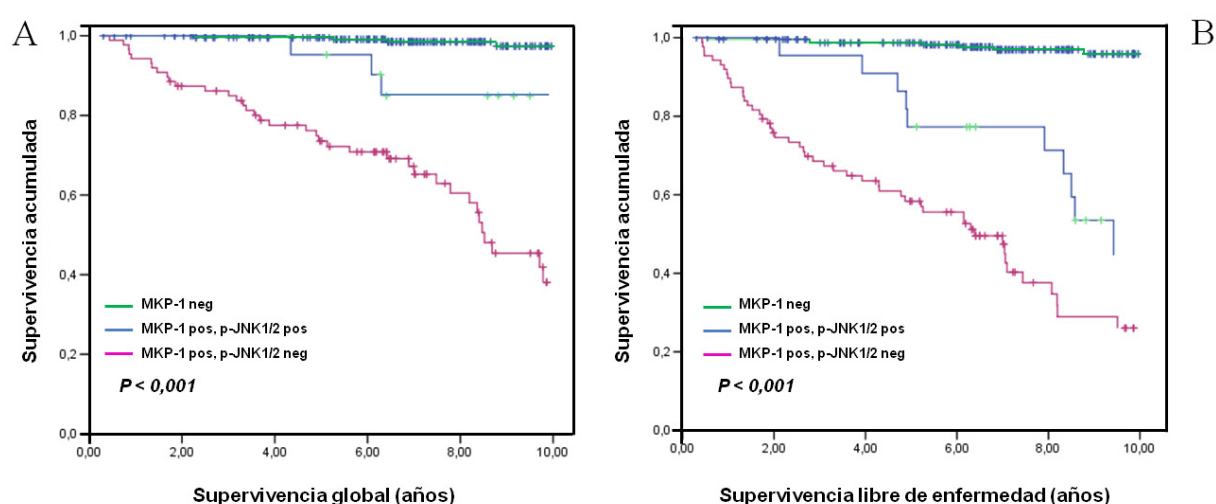


Figura 43. Significado clínico de la expresión de MKP-1 y p-JNK1/2 en carcinoma de mama. Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia global (A) y la supervivencia libre de enfermedad (B) en la cohorte de 350 pacientes de carcinoma de mama.

Finalmente, el análisis multivariante de Cox demostró que los niveles de MKP-1 y p-JNK1/2 funcionaban en conjunto como un factor adverso asociado con la supervivencia global (HR 26,1; 95% CI, 10,1-67,4; $p < 0,001$) (Tabla 6) y la supervivencia libre de enfermedad (HR 33,4; 95% CI, 14,8-75,4; $p < 0,001$) (Tabla 7) en el cáncer de mama precoz, con independencia del resto de factores utilizados en el diagnóstico de la enfermedad.

Todos estos datos clínicos muestran que la sobreexpresión de MKP-1 y la inhibición de la fosforilación de JNK1/2 constituyen dos eventos moleculares claves en el carcinoma de mama humano precoz, que pueden determinar la supervivencia de las pacientes y su beneficio clínico a la quimioterapia adyuvante.

Tabla 6. Análisis univariante y multivariante de Cox de la supervivencia global en la cohorte de 350 pacientes de carcinoma de mama.

	Análisis Univariante				Análisis Multivariante			
	HR	95% CI		Significancia	HR	95% CI		Significancia
T				<0,001				0,104
I	1,000				1,000			
II	2,729	1,505	a	4,946	1,474	0,711	a	3,054
III	3,672	1,636	a	8,246	1,457	0,494	a	4,299
IV	13,557	3,966	a	46,341	9,308	1,546	a	56,036
N				<0,001				0,013
0	1,000				1,000			
1	1,639	0,854	a	3,143	0,958	0,443	a	2,071
2	2,236	1,023	a	4,887	0,499	0,147	a	1,692
3	6,961	3,537	a	13,700	2,926	1,251	a	6,844
Grado				0,045				0,796
1	1,000				1,000			
2	1,368	0,559	a	3,347	1,464	0,480	a	4,466
3	2,377	0,989	a	5,717	1,426	0,450	a	4,521
ER				0,006				0,014
Negativo	1,000				1,000			
Positivo	0,477	0,285	a	0,797	0,430	0,219	a	0,845
HER2				0,173				
Negativo	1,000							
Positivo	1,510	0,851	a	2,678				
Ki-67				0,832				
Bajo	1,000							
Alto	0,937	0,515	a	1,707				
Quimioterapia				0,580				
Sin quimioterapia	1,000							
Adyuvante	0,728	0,362	a	1,463				
Neoadyuvante	0,962	0,373	a	2,481				
Terapia hormonal				0,342				
No	1,000							
Si	0,754	0,425	a	1,338				
MKP-1 y p-JNK1/2				<0,001				<0,001
MKP-1 neg	1,000				1,000			
MKP-1 pos, p-JNK1/2 pos	4,923	1,172	a	20,674	4,518	1,070	a	19,081
MKP-1 pos, p-JNK1/2 neg	29,314	11,523	a	74,575	26,086	10,103	a	67,353

Tabla 7. Análisis univariante y multivariante de Cox de la supervivencia libre de enfermedad en la cohorte de 350 pacientes de carcinoma de mama.

	Análisis Univariante				Análisis Multivariante			
	HR	95% CI		Significancia	HR	95% CI		Significancia
T				0,001				0,545
I	1,000				1,000			
II	1,940	1,236	a 3,045		1,390	0,768	a 2,514	
III	2,425	1,250	a 4,702		1,368	0,563	a 3,323	
IV	7,261	2,226	a 23,689		8,739	1,677	a 43,314	
N				<0,001				0,032
0	1,000				1,000			
1	1,357	0,822	a 2,241		0,768	0,405	a 1,457	
2	1,739	0,928	a 3,259		0,476	0,152	a 1,493	
3	4,350	2,399	a 7,886		2,220	1,028	a 4,793	
Grado				0,101				
1	1,000							
2	0,658	0,353	a 1,227					
3	0,629	0,404	a 0,978					
ER				0,035				0,298
Negativo	1,000				1,000			
Positivo	0,624	0,407	a 0,956		0,655	0,296	a 1,453	
HER2				0,017				0,218
Negativo	1,000				1,000			
Positivo	1,770	1,129	a 2,775		1,433	0,808	a 2,542	
Ki-67				0,411				
Bajo	1,000							
Alto	1,211	0,772	a 1,899					
Quimioterapia				0,678				
Sin quimioterapia	1,000							
Adyuvante	1,094	0,576	a 2,077					
Neoadyuvante	1,416	0,617	a 3,246					
Terapia hormonal				0,050				0,892
No	1,000				1,000			
Si	0,636	0,409	a 0,990		1,054	0,491	a 2,264	
MKP-1 y p-JNK1/2				<0,001				<0,001
MKP-1 neg	1,000				1,000			
MKP-1 pos, p-JNK1/2 pos	21,037	8,369	a 52,881		18,393	7,056	a 47,944	
MKP-1 pos, p-JNK1/2 neg	35,920	16,216	a 79,563		33,353	14,764	a 75,350	

4.2.2. Valor clínico de la expresión de MKP-1 en el cáncer de mama local avanzado tratado en neoadyuvancia con quimioterapia

A continuación, determinamos por inmunohistoquímica la expresión de MKP-1 y p-JNK1/2 en una serie independiente de 64 biopsias de pacientes con carcinoma de mama local avanzado que fueron tratadas con quimioterapia neoadyuvante basada en taxanos. Las características de estas pacientes están recogidas en la Tabla 8. El tiempo medio transcurrido desde la biopsia diagnosticada hasta el comienzo de la quimioterapia fue de 21,3 días (rango 1-48 días). Durante ese periodo de tiempo, las pacientes fueron sometidas a una estadificación tumoral clínica y radiológica estándar. Posteriormente, recibieron una media de 4 ciclos de quimioterapia neoadyuvante (rango 2-6 ciclos), y en todos los casos, el régimen quimioterápico incluyó agentes del grupo de los taxanos. Tras la recuperación de los efectos derivados de la quimioterapia, las pacientes fueron sometidas a cirugía. El tiempo medio transcurrido entre la dosis final de quimioterapia y la obtención de la biopsia post-quimioterapia proveniente de la cirugía, fue de 30,3 días (rango 8-59 días).

De las 64 pacientes, 18 (28,1%) lograron una pCR tras la evaluación histopatológica de la biopsia post-quimioterapia. Como hecho destacado, observamos que los niveles de MKP-1 y p-JNK1/2 correlacionaban negativamente con la respuesta patológica ($p = 0,008$) (Tabla 9). Este dato clínico permite suponer que esta determinación molecular podría predecir la resistencia del tumor de mama a docetaxel.

Tabla 9. Determinación de MKP-1 y p-JNK1/2 en biopsias de pacientes de carcinoma de mama localmente avanzado tratados con quimioterapia neoadyuvante TC (docetaxel + ciclofosfamida).

	MKP-1 neg	MKP-1 pos, p-JNK1/2 pos	MKP-1 pos, p-JNK1/2 neg
Muestras previas a quimioterapia (n=64)	(n=36)	(n=13)	(n=15)
Respuesta patológica completa	15	3	0
No respuesta patológica completa	21	10	15
Índice de respuesta global	41,6%	23,1%	0%
Valor de P		0,008	

Tabla 8. Características clínicas y moleculares de 64 biopsias de pacientes con carcinoma de mama local avanzado que recibieron quimioterapia neoadyuvante TC (docetaxel + ciclofosfamida).

		No. (%)	
Edad			
	56 (34-71)		
T			
	II	8	(12,5)
	III	56	(87,5)
N			
	0	42	(65,6)
	1	18	(28,1)
	2	4	(6,3)
Grado			
	1	5	(7,8)
	2	44	(68,8)
	3	15	(23,4)
Tipo histológico			
	IDC	62	(96,9)
	ILC	2	(3,1)
ER			
	Negativo	20	(31,3)
	Positivo	44	(68,8)
PR			
	Negativo	28	(43,8)
	Positivo	36	(56,3)
HER2			
	Negativo	64	(100)
	Positivo	0	
Estadio hormonal			
	Premenopáusica	17	(26,6)
	Postmenopáusica	47	(73,4)
Ki-67			
	Bajo	38	(59,4)
	Alto	26	(40,6)
Régimen de quimioterapia neoadyuvante			
	TC	64	(100)
Respuesta patológica			
	Respuesta completa	18	(28,1)

4.3. La activación inducida de PP2A modula la respuesta a doxorrubicina en el cáncer de mama

4.3.1. Inactivación de PP2A en líneas celulares de carcinoma de mama

Con la idea de continuar entendiendo los mecanismos moleculares de la expresión de MKP-1 y sus consecuencias en la inhibición de JNK1/2, encontramos un estudio en el cual se demostraba que el efecto antiapoptótico de MKP-1 requería de un complejo transitorio entre MKP-1, JNK1/2 y la subunidad catalítica de PP2A (PP2Ac) [192]. Como el modelo celular utilizado en el citado estudio no se corresponde con el carcinoma de mama, quisimos examinar la posibilidad de que este mismo complejo se formase en nuestras células tumorales de mama y que, en el modelo de sobreexpresión de MKP-1, dicho complejo transitorio sufriese algún cambio, así como en las diferentes condiciones de tratamiento con los fármacos docetaxel y doxorrubicina.

Para ello, se transfectaron células MDA-MB-231 con pCMV-HA-MKP-1, para posteriormente tratarlas con Ro-31-8220 y, a continuación, con los fármacos docetaxel o doxorrubicina durante 24 horas. Los extractos de proteínas se analizaron para cuantificar, por western blotting, los cambios en la expresión de MKP-1, p-JNK1/2 y PP2Ac (Figura 44). Los resultados no aclararon del todo la posible formación transitoria de este complejo molecular, ya que los niveles de abundancia de PP2Ac no resultaron dependientes de la expresión de MKP-1 o p-JNK, como en el trabajo anteriormente citado [192]. Sin embargo, encontramos niveles muy elevados de p-PP2A en nuestras células tumorales de mama (Figura 44).

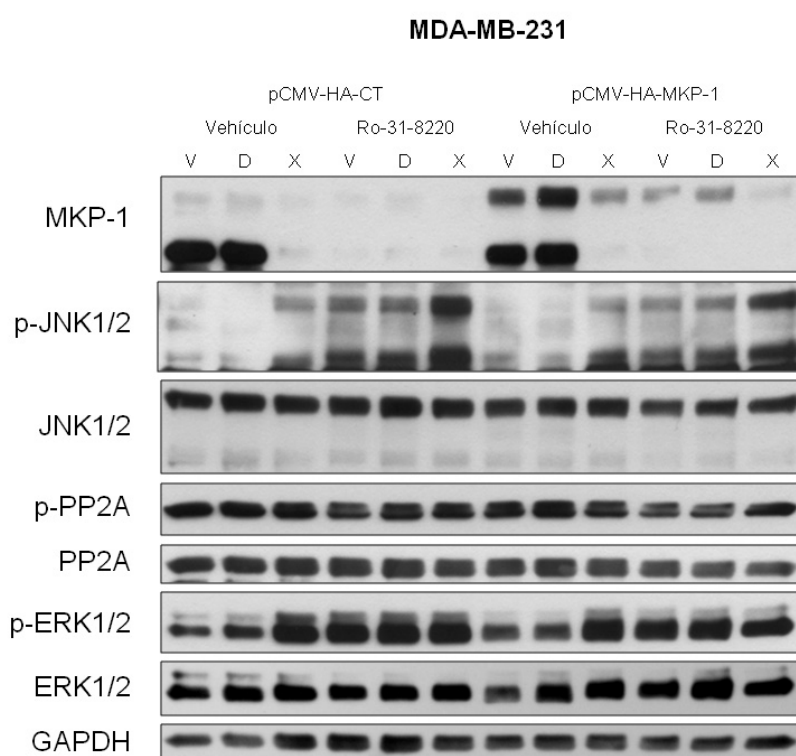


Figura 44. SDS-PAGE al 10% de acrilamida/bis-acrilamida de extractos de células MDA-MB-231 parentales y sobreexpresando MKP-1; tras el crecimiento en presencia del agente Ro-31-8220 (5 µg/ml); y el tratamiento con docetaxel (D; 50 nmol/L) y doxorrubicina (X; 10 µmol/L), durante 24 horas. Posterior inmunodetección por western blotting de MKP-1, p-JNK1/2, JNK1/2, fosfo-PP2A, PP2A y GAPDH (control de carga). pCMV-HA-CT: vector vacío. pCMV-HA-MKP-1: vector de expresión de MKP-1.

Así, quisimos cuantificar los niveles de inhibición de PP2A en modelos *in vitro* de carcinoma de mama (expresión de p-PP2A y de sus inhibidores endógenos CIP2A y SET). En este caso, incluimos no sólo algunas líneas celulares más, sino también muestras sanas de tejido mamario, para realizar una primera revisión de la expresión de todas estas proteínas inhibidoras de PP2A, incluyendo la forma fosforilada de la misma.

La Figura 45 muestra los resultados de análisis de expresión de las proteínas CIP2A, SET y p-PP2A en 5 líneas celulares de carcinoma de mama y 3 muestras sanas de tejido mamario. Todas las líneas celulares mostraron hiperfosforilación de PP2A en paralelo a la sobreexpresión de CIP2A y SET. No ocurrió así con las muestras de mama sana, que mostraron niveles bajos de estas proteínas. Por lo tanto, la actividad de esta proteína fosfatasa debía estar bastante inhibida en las líneas celulares en comparación con las muestras sanas de mama. Para verificar la inhibición funcional de PP2A, realizamos una cuantificación específica de su actividad enzimática fosfatasa. Todas las líneas celulares mostraron un nivel de actividad fosfatasa específica significativamente menor que las muestras sanas utilizadas (Figura 46). En consecuencia, pudimos confirmar que la inhibición de PP2A es un evento común en las células tumorales de mama utilizadas, pero no así en las muestras sanas de mama.

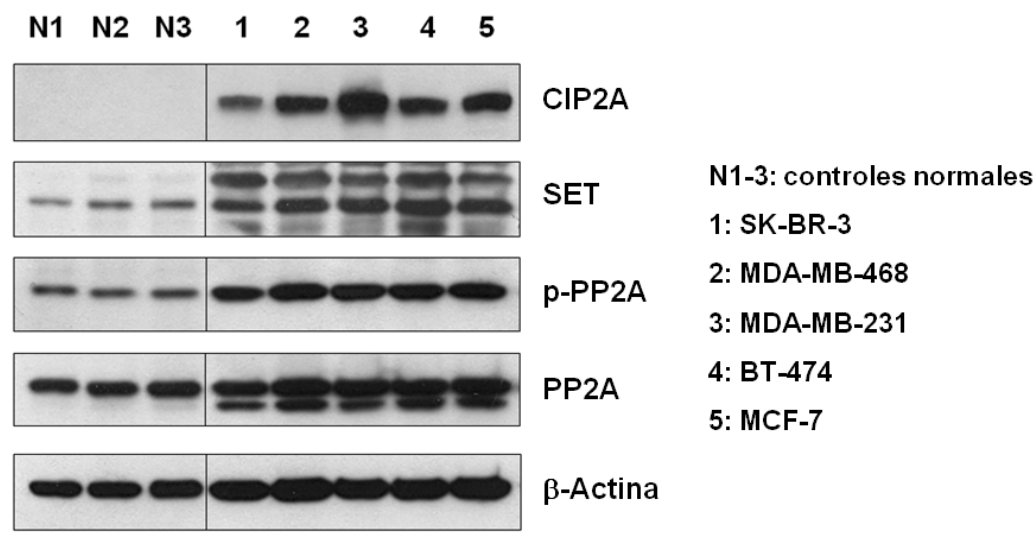


Figura 45. SDS-PAGE al 10% de acrilamida/bis-acrilamida de extractos de líneas celulares de cáncer de mama y muestras normales (tejido mamario sano; Biobanco de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid). Posterior inmunodetección por western blotting de fosfo-PP2A, PP2A, CIP2A, SET y β-actina (control de carga).

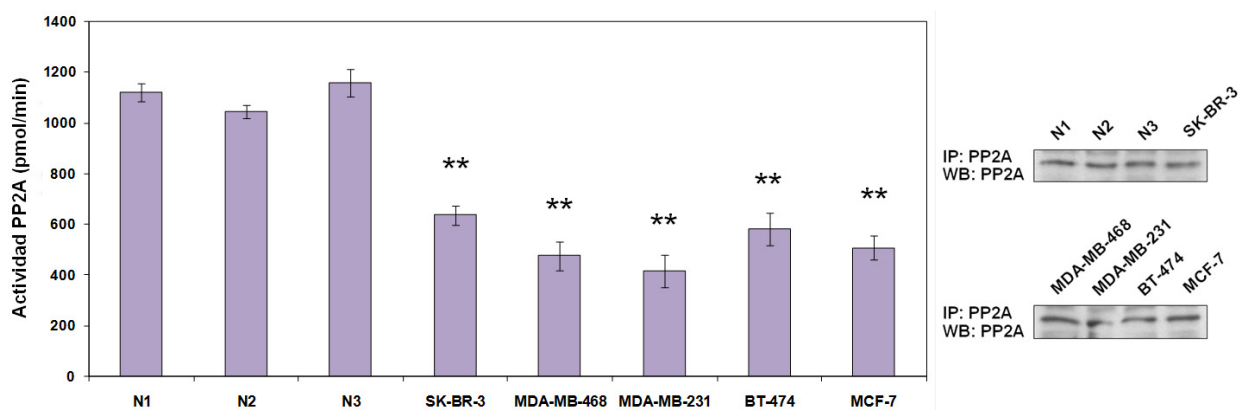


Figura 46. Cuantificación de la actividad PP2A y niveles de expresión de proteínas (SDS-PAGE y Western Blotting) de los inmunoprecipitados de PP2A provenientes de los extractos de proteínas utilizados en los ensayos de actividad fosfatasa. Datos representados son medias \pm EEM de 3 experimentos. N1-3: controles normales consistentes en biopsias de tejidos mamario sano obtenidos del Biobanco de la Fundación Jiménez Díaz (Madrid, España). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

Con el fin de esclarecer la conexión entre la inhibición de PP2A y su actividad enzimática, nos propusimos silenciar los dos inhibidores endógenos de PP2A (CIP2A y SET) en las líneas celulares MDA-MB-231 y BT-474, para comprobar su efecto en la actividad fosfatasa de PP2A. Para ello, transfectamos ambas líneas celulares con ARNsi específicos. La expresión de proteínas mostró cómo, en las dos líneas celulares, ambos ARNsi de SET funcionaron satisfactoriamente, mientras que en el caso de CIP2A, sólo uno de los ARNsi consiguió una reducción de la expresión de proteína en las células BT-474; en cambio, ambas construcciones bajaron la expresión de CIP2A en MDA-MB-231 (Figura 47).

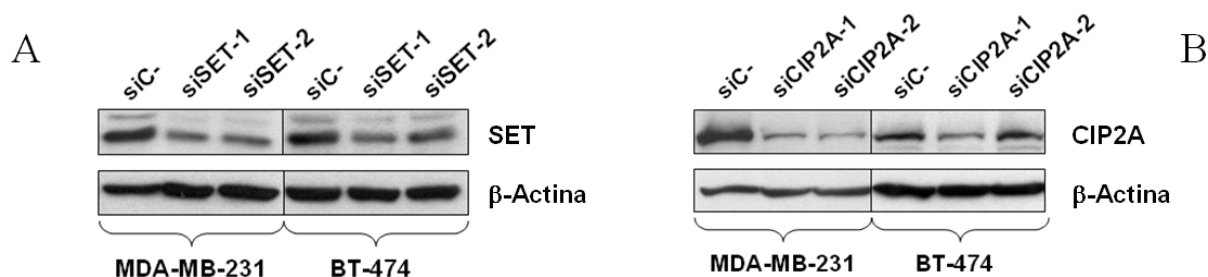


Figura 47. SDS-PAGE al 10% de acrilamida/bis-acrilamida de extractos de células MDA-MB-231 y BT-474 transfectadas con dos ARNsi específicos para SET (A) y CIP2A (B). Posterior inmunodetección por western blotting de SET, CIP2A y β -actina (control de carga).

La cuantificación de la actividad fosfatasa de PP2A en estos experimentos de transfección mostró una relación con el silenciamiento de cada construcción, provocando en el caso de las células MDA-MB-231 un aumento de la actividad fosfatasa específica con los cuatro

ARNsi (tanto los de SET como los de CIP2A) (Figura 48A). En el caso de las células BT-474, salvo el silenciamiento de CIP2A que no consiguió la reducción de su expresión, todo el resto de transfecciones provocaron el aumento en la actividad fosfatasa de PP2A (Figura 48B).

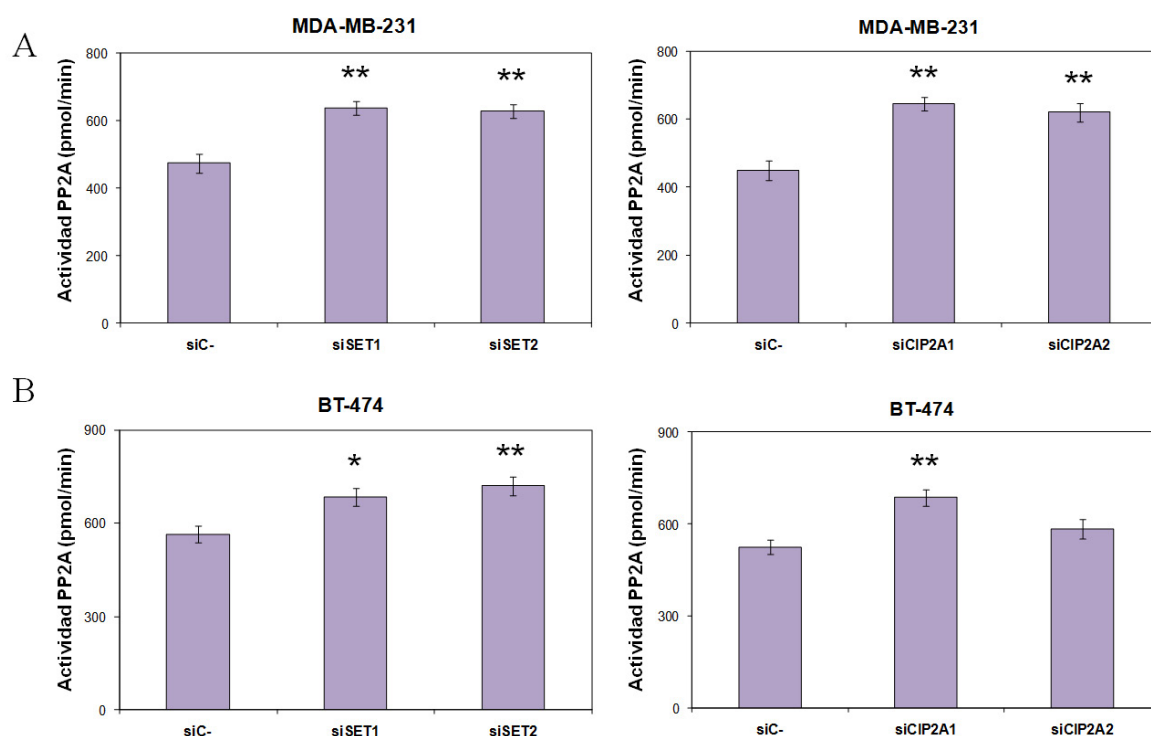


Figura 48. Cuantificación de la actividad PP2A de los inmunoprecipitados de PP2A provenientes de células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B) previamente transfectadas con ARNs de interferencia específicos para SET y CIP2A. Datos representados son medias \pm EEM de 3 experimentos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

Todos estos resultados nos proporcionaron la idea de que la actividad de PP2A se encontraba inhibida en las células de carcinoma de mama, y que dicha inhibición estaba producida tanto por sus inhibidores endógenos SET y CIP2A como por su propia hiperfosforilación.

4.3.2. La activación de PP2A por FTY720 tiene un efecto antitumoral en líneas celulares de carcinoma de mama

Con el fin de profundizar en la importancia biológica de la desregulación de PP2A en el cáncer de mama, nos preguntamos si su activación podría tener efectos en la viabilidad celular de las células de carcinoma de mama, sobre todo teniendo en cuenta su generalizada actividad como proteína supresora de tumores.

Para ello, utilizamos un inmunosupresor químico llamado FTY720, que ha demostrado capacidad de estimulación de la actividad fosfatasa de PP2A en distintos tipos de cáncer [193]. En las líneas celulares MDA-MB-231 y BT-474 determinamos la IC_{50} de FTY720, utilizando el ensayo

MTS para medir viabilidad celular. Obtuvimos unos valores de IC_{50} en torno a $10 \mu\text{mol/L}$ en ambas líneas celulares, a 24 horas (Figura 49). En consecuencia, decidimos utilizar esta concentración de FTY720 para tratar nuestras células.

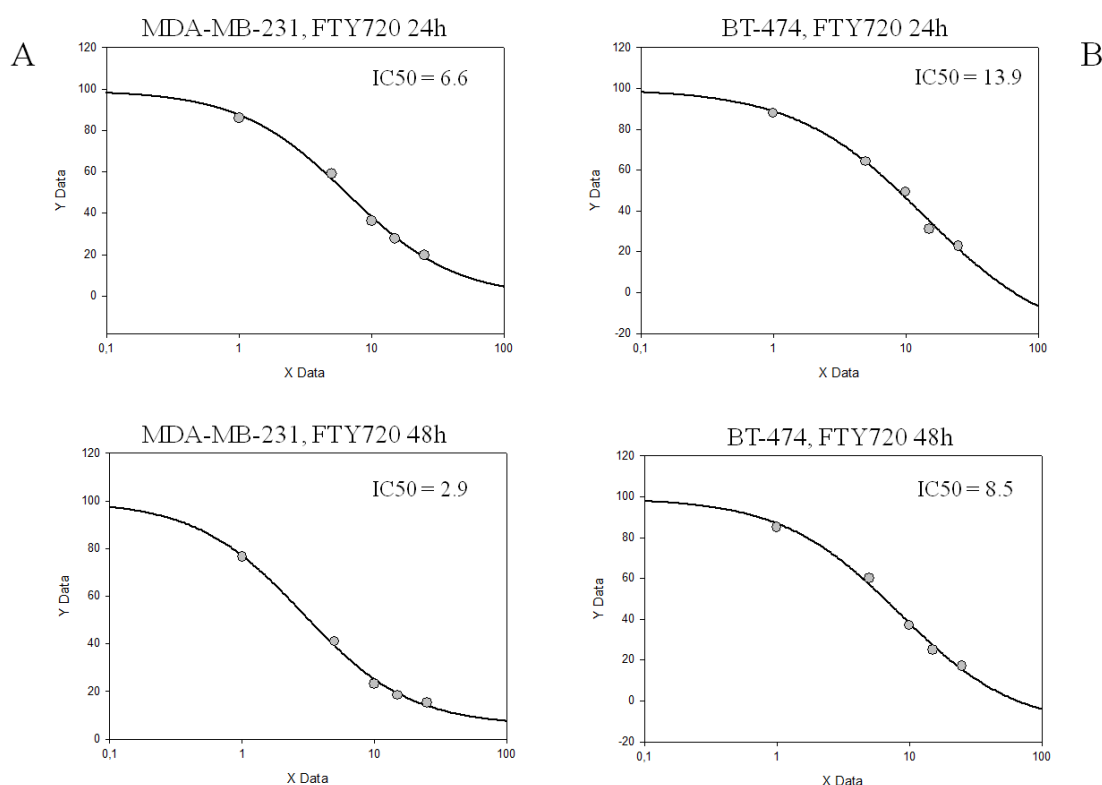


Figura 49. Valores IC_{50} de FTY720 en células de carcinoma de mama. Curvas sigmoideas dosis-respuesta de cuatro parámetros de células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B) tratadas con FTY720 durante 24 y 48 horas. X Data: concentración de FTY720 ($\mu\text{mol/L}$), en escala logarítmica; Y Data: porcentaje de viabilidad celular promedio (medias \pm EEM de 3 experimentos) tras cuantificación del ensayo MTS.

Para estudiar la modulación de la actividad de PP2A por FTY720 utilizamos también ácido okadaico (OA), que es un agente inhibidor no específico de la actividad fosfatasa. La concentración utilizada de este inhibidor ($2,5 \text{ nmol/L}$) fue previamente descrita como efectiva a la hora de inhibir PP2A [194]. Tanto en MDA-MB-231 como en BT-474, la actividad PP2A aumentó significativamente tras el tratamiento con FTY720 durante 24 horas (Figura 50). Por el contrario, el pre-tratamiento de las células con OA durante 90 minutos inhibió esta activación de PP2A producida por FTY720 (Figura 50). Por otra parte, el tratamiento con FTY720 bajó significativamente la viabilidad celular de ambos tipos de células, desde 24 y hasta 72 horas de tratamiento (Figura 51). La combinación entre FTY720 y OA aumentó la viabilidad de las células, ya que la inhibición de PP2A por OA provocó una recuperación parcial de la supervivencia de las células tumorales.

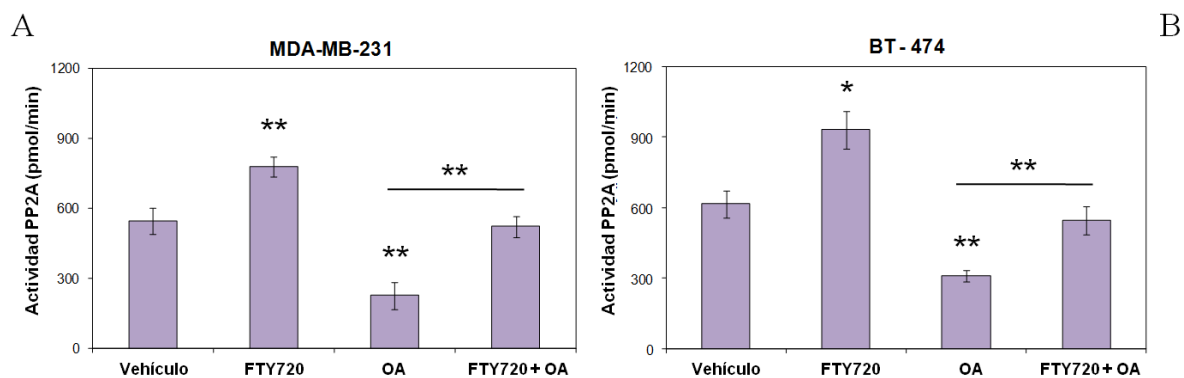


Figura 50. Cuantificación de la actividad PP2A de los inmunoprecipitados de PP2A provenientes de células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B) previamente tratados con FTY720 (10 µmol/L) o ácido okadaico (OA, 2.5 nmol/L). Datos representados son medias \pm EEM de 3 experimentos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

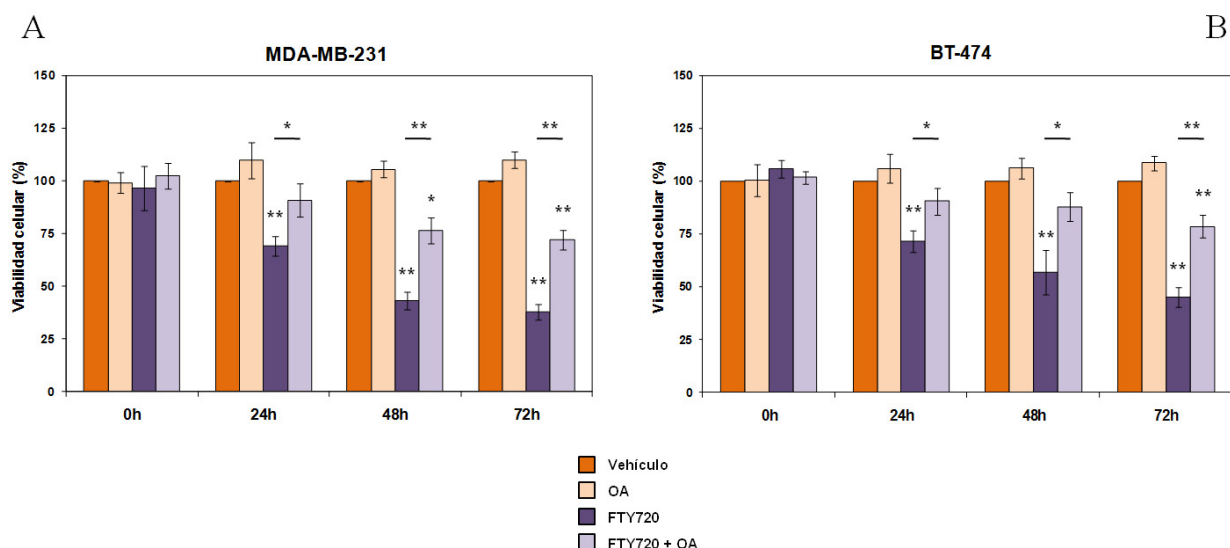


Figura 51. Viabilidad celular de las células de carcinoma de mama frente a FTY720. Cuantificación de la viabilidad celular por ensayo MTS, de células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B) frente a FTY720 (10 µmol/L) y ácido okadaico (OA; 2.5 nmol/L), a diferentes tiempos. Datos representados: porcentaje relativo del promedio (medias \pm EEM de 3 experimentos) de la cuantificación del ensayo MTS a $\lambda = 460$ nm. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

Finalmente, cuantificamos la activación de caspasa 3 y 7 en ambos tipos celulares para analizar los inicios de activación de rutas de apoptosis en estas condiciones de tratamiento. Los resultados muestran cómo FTY720 fue decisivo a la hora de activar apoptosis en nuestras células (Figura 52).

Todos estos resultados confirmaron que en células tumorales de mama con un elevado nivel de inhibición de PP2A, el tratamiento con un agente activador de su actividad fosfatasa reduce la capacidad proliferativa de estas células.

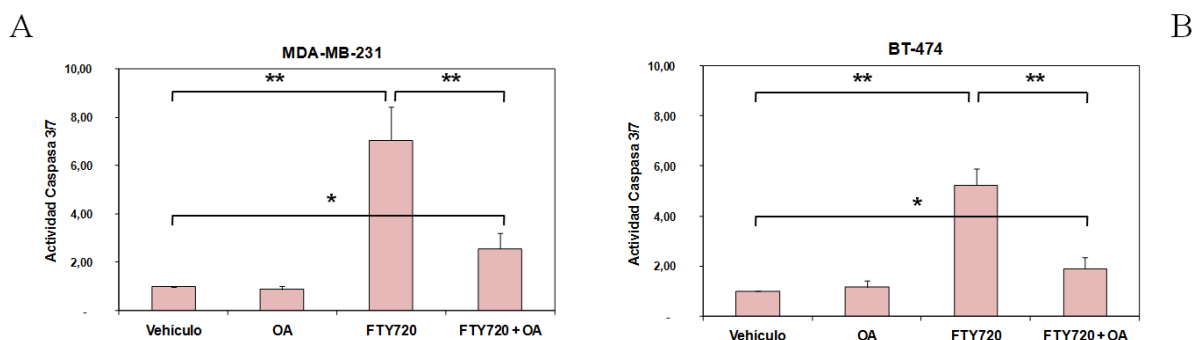


Figura 52. Activación de apoptosis en células de carcinoma de mama tratadas con FTY720. Cuantificación de la actividad de caspasa 3 y 7 de células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B) tras el tratamiento, durante 24 horas, con FTY720 (10 μ mol/L) y ácido okadaico (OA; 2.5 nmol/L). Datos representados: porcentaje relativo del promedio (medias \pm EEM de 3 experimentos) de la cuantificación del kit comercial de actividad de caspasa 3 y 7 a $\lambda = 490$ nm. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

4.3.3. Efecto celular y molecular de la activación de PP2A en el tratamiento de líneas celulares de carcinoma de mama con doxorrubicina

Llegados a este punto, nos preguntamos si la activación específica de PP2A podría mejorar el efecto antitumoral de la quimioterapia.

En primer lugar, determinamos el efecto de la combinación de FTY720 con doxorrubicina sobre la viabilidad celular de células MDA-MB-231 y BT-474 (como controles, tratamiento con FTY720 o doxorrubicina) hasta un tiempo de 72 horas. La combinación entre FTY720 y doxorrubicina mostró efectos aditivos en las células MDA-MB-231 (CI = 0.99); y efectos sinérgicos en BT-474 (CI = 0.87). Como se puede observar en las Figuras 53 y 54, la activación de PP2A por FTY720 mejoró el efecto antitumoral de doxorrubicina en ambas líneas celulares. El tratamiento combinado provocó además alteraciones morfológicas en las células (Figuras 53B y 53B). En paralelo, el análisis de proteínas por western blotting de estos experimentos mostró que el tratamiento con FTY720 provocaba una reducción en la expresión de CIP2A y en la hiperfosforilación de PP2A producida por FTY720 en ambas líneas celulares (Figura 55). Esto no ocurría con doxorrubicina, aunque el tratamiento combinado de FTY720 y doxorrubicina volvía a mostrar el mismo efecto de FTY720 en estas proteínas. Además, FTY720 redujo significativamente la fosforilación de ERK y AKT, tanto en el tratamiento individual como en el combinado (Figura 55). Sin embargo, los niveles de SET no se vieron alterados en ninguna de las condiciones de los tratamientos.

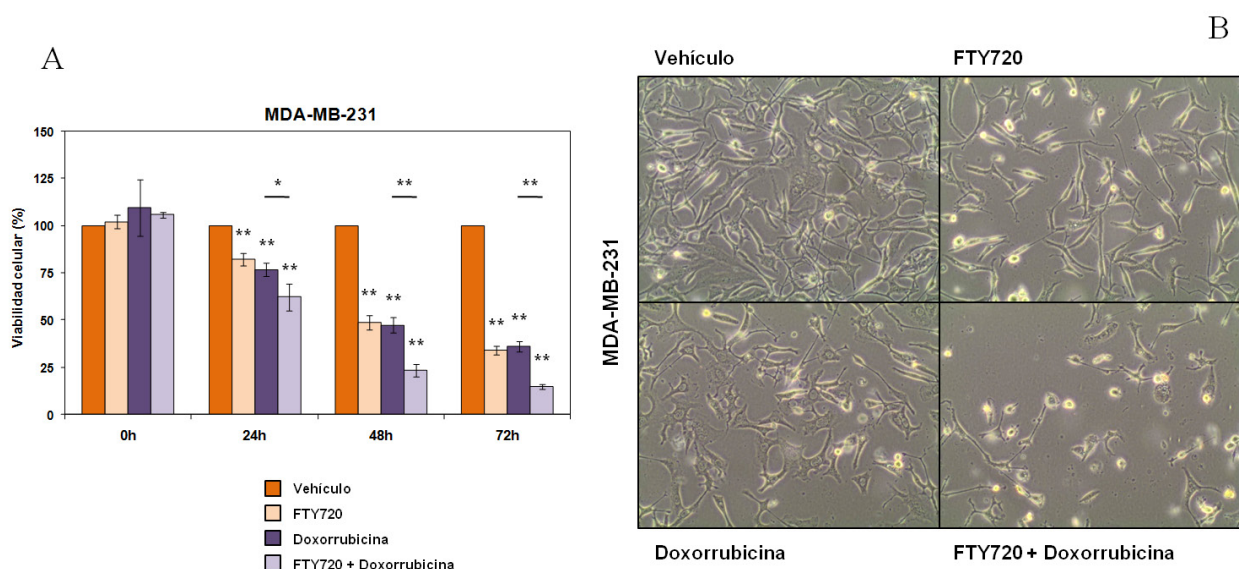


Figura 53. Viabilidad celular de las células de carcinoma de mama frente a FTY720 y doxorubicina. A) Cuantificación de la viabilidad celular por ensayo MTS, de células MDA-MB-231 frente a FTY720 (10 μ mol/L) y doxorubicina (10 μ mol/L), a diferentes tiempos. Datos representados: porcentaje relativo del promedio (medias \pm EEM de 3 experimentos) de la cuantificación del ensayo MTS a λ = 460 nm. B) Imágenes de microscopía óptica de células MDA-MB-231 tras 24 horas frente a los fármacos anteriormente comentados. * p <0,05; ** p <0,01 vs control.

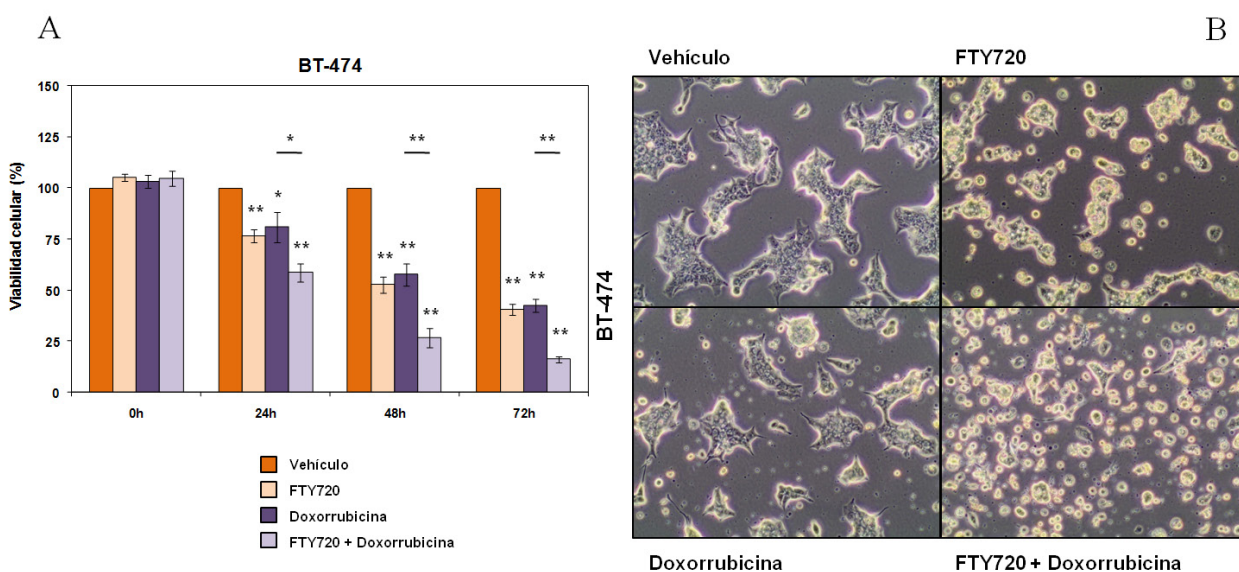


Figura 54. Viabilidad celular de las células de carcinoma de mama frente a FTY720 y doxorubicina. A) Cuantificación de la viabilidad celular por ensayo MTS, de células BT-474 frente a FTY720 (10 μ mol/L) y doxorubicina (10 μ mol/L), a diferentes tiempos. Datos representados: porcentaje relativo del promedio (medias \pm EEM de 3 experimentos) de la cuantificación del ensayo MTS a λ = 460 nm. B) Imágenes de microscopía óptica de células BT-474 tras 24 horas frente a los fármacos anteriormente comentados. * p <0,05; ** p <0,01 vs control.

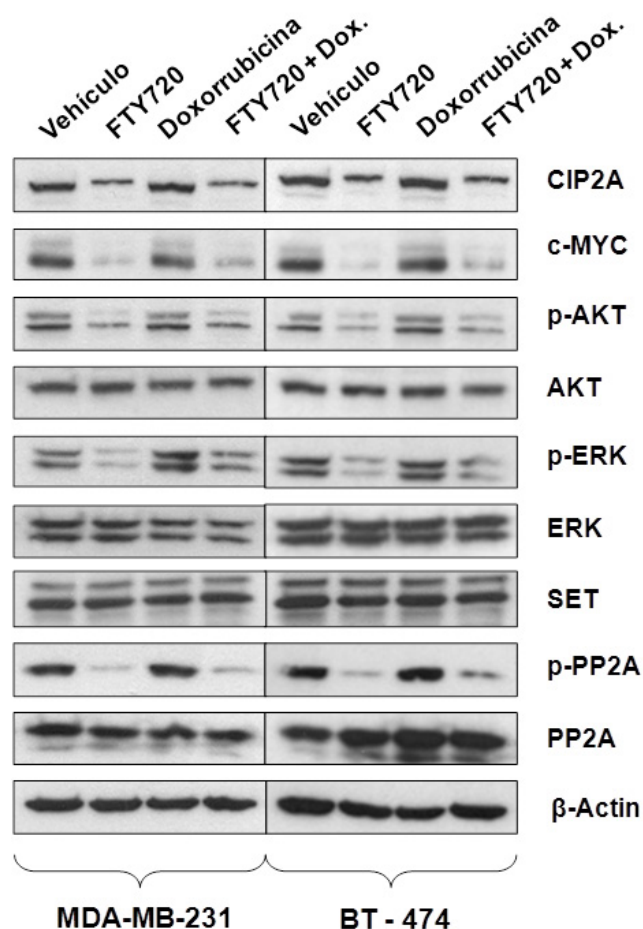


Figura 55. SDS-PAGE al 10% de acrilamida/bis-acrilamida de extractos de células MDA-MB-231 y BT-474 tras 24 horas de tratamiento con FTY720 (10 $\mu\text{mol/L}$) y doxorubicina (10 $\mu\text{mol/L}$). Posterior inmunodetección por western blotting de p-PP2A, PP2A, CIP2A, SET, c-MYC, p-AKT, AKT, p-ERK1/2, ERK1/2 y β -actina (control de carga).

Para comprobar si el efecto de FTY720 sobre PP2A y CIP2A era pre o post-traducciona, analizamos la expresión génica por PCR a tiempo real. Confirmamos que la inhibición de la fosforilación de PP2A inducida por este agente se producía post-traducciona, ya que ni el ARNm ni la proteína de PP2A se vio modificada por ninguno de los tratamientos realizados, en ninguna de las dos líneas celulares. Además, confirmamos que el efecto de FTY720 en CIP2A era también post-traducciona (Figura 56).

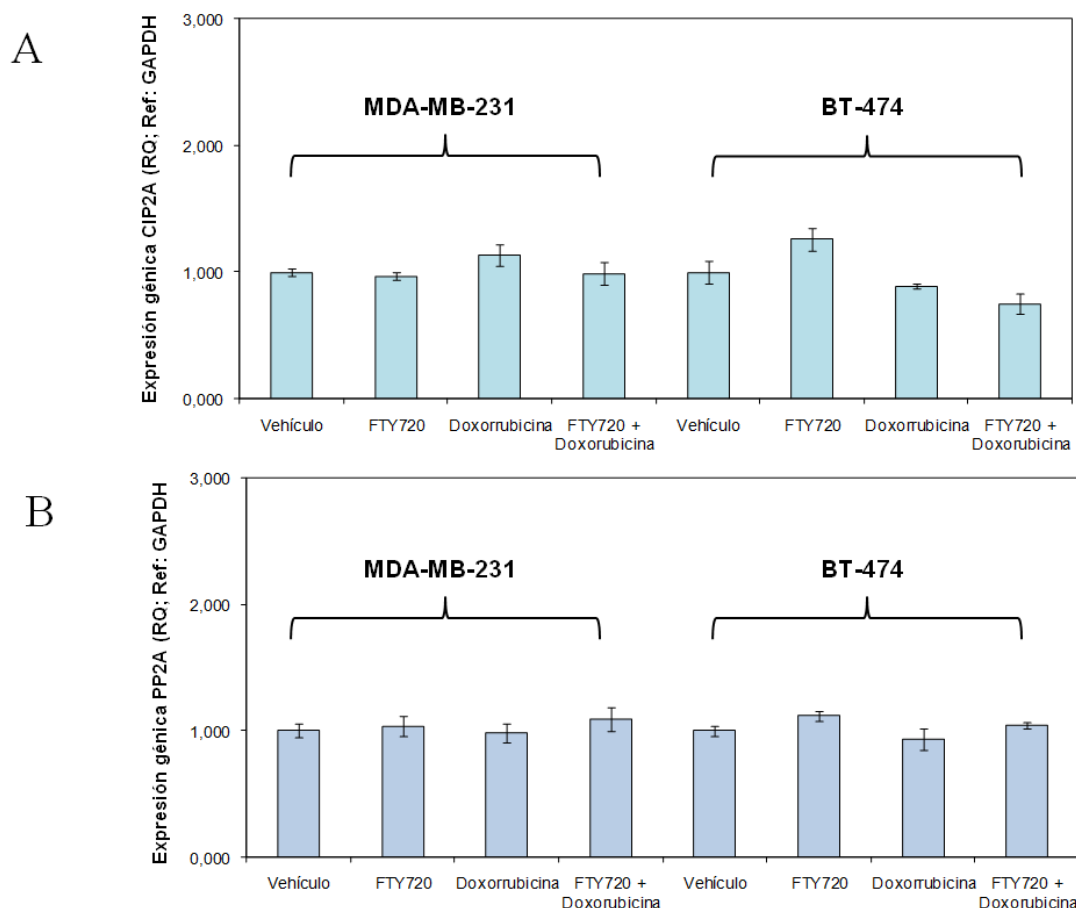


Figura 56. Cuantificación de la expresión génica, mediante PCR cuantitativa a tiempo real, de los genes CIP2A (A) y PP2A (B) en células MDA-MB-231 y BT-474 tras 24 horas de tratamiento con FTY720 (10 μ mol/L) y doxorubicina (10 μ mol/L). Los valores son RQ medias \pm EEM de 3 experimentos. Gen de referencia: GAPDH. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ vs control.

Comprobada esta capacidad de FTY720 para acentuar el efecto terapéutico de doxorubicina en las células tumorales de mama, nos preguntamos si unas células de cáncer de mama con resistencia adquirida a esta antraciclina podrían ser tratadas exitosamente con la combinación FTY720-doxorubicina. Para responder a esta cuestión, desarrollamos clones de células MDA-MB-231 y BT-474 resistentes a doxorubicina generados por resistencia adquirida a partir de células parentales tratadas de forma continua con doxorubicina durante 6 meses. La figura 57 muestra los resultados después de tratar los clones de resistencia a doxorubicina con FTY720, doxorubicina y la combinación entre ambos. En este caso, la diferencia de partida entre líneas celulares resistentes fue relevante debido a la diferencia en los ratios IC_{50} para doxorubicina de cada clon. Las células MDA-MB-231 resistentes a doxorubicina, con un ratio IC_{50} de 1,92, mostraron mayor resistencia al tratamiento con la antraciclina en todos los tiempos cuantificados (Figura 57A). En cambio, las células BT-474 resistentes a doxorubicina, con un ratio IC_{50} de 1,35, no mostraron resistencia a este fármaco (Figura 57B). En cuanto a FTY720, mientras en las células BT-474 resistentes no se cuantificó casi diferencia respecto a las parentales, en las células MDA-MB-231 resistentes a

doxorrubicina se dio una incidencia mayor del efecto en la viabilidad celular tras el tratamiento con el agente, sobre todo a 48 horas de tratamiento, hecho que se produjo en el tratamiento combinado FTY720-doxorrubicina hasta 72 horas (Figura 57A). Por lo tanto, estos resultados de tratamiento de clones celulares resistentes a doxorrubicina mostraron una cierta capacidad de FTY720 para mejorar los efectos antitumorales de doxorrubicina en las células tumorales de mama.

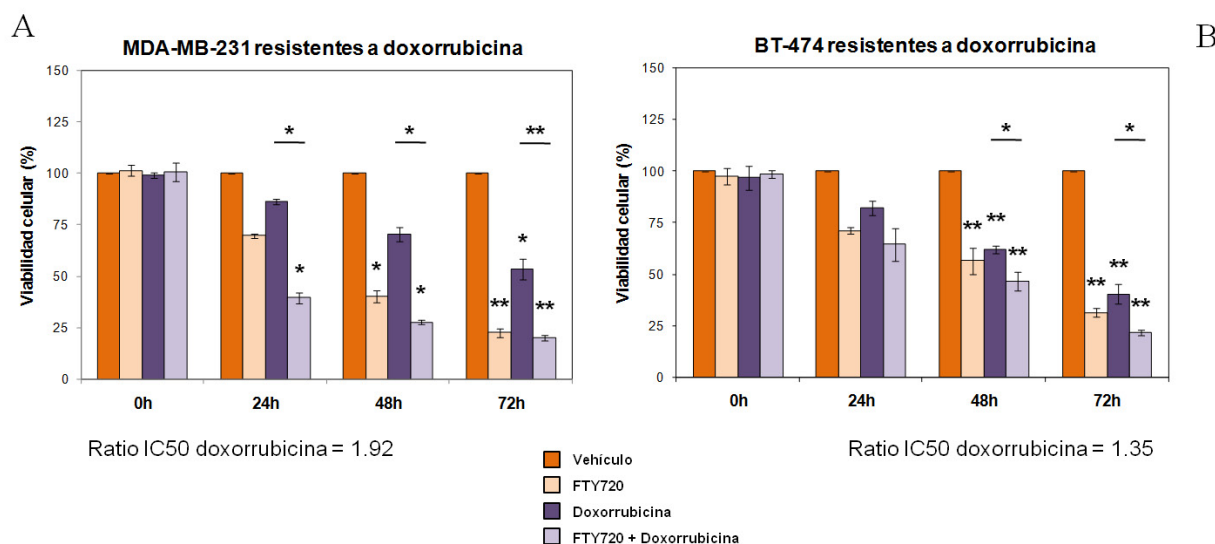


Figura 57. Viabilidad celular de las células de mama resistentes a doxorrubicina, frente a FTY720 y doxorrubicina. Cuantificación de la viabilidad celular por ensayo MTS, de células MDA-MB-231 (A) y BT-474 (B) resistentes a doxorrubicina; frente a FTY720 (10 μ mol/L) y doxorrubicina (10 μ mol/L), a diferentes tiempos. Datos representados: porcentaje relativo del promedio (medias \pm EEM de 3 experimentos) de la cuantificación del ensayo MTS a λ = 460 nm. * p <0,05; ** p <0,01 vs control.

Asimismo, valoramos el efecto de la activación de PP2A sobre el tratamiento con doxorrubicina en mamóferas. El crecimiento de células en cultivo en esfera supone la aparición de un fenotipo similar al de células madre, que se relaciona en general con una mayor resistencia a la quimioterapia. Las células MDA-MB-231 no dieron lugar a mamóferas, mientras que las células BT-474 si produjeron fácilmente este tipo de crecimiento en suspensión formando esferas de células. Las concentraciones de los fármacos FTY720 y doxorrubicina utilizadas en los tratamientos de las líneas celulares resultaron devastadoras a la hora de tratar las mamóferas. Tras varias pruebas, realizamos estos tratamientos a condiciones más viables: 1 μ mol/L de FTY720 y 1 μ mol/L de doxorrubicina (Figura 58). Realizamos dos tipos de experimentos: en el primero, las células BT-474 sembradas en condiciones stem-like crecieron, desde el momento de la siembra, en presencia de cada condición de tratamiento; en el segundo, las células crecieron durante 7 días para formar las mamóferas, tras lo cual fueron tratadas durante 48 horas con los diferentes fármacos. La Figura 59 muestra el resultado de los experimentos de formación de mamóferas en presencia de FTY720, doxorrubicina y la combinación de ambos. Como se puede comprobar, doxorrubicina redujo a la

mitad la formación de mamíferas y la combinación con FTY720 la inhibió casi totalmente (Figura 59). La Figura 60A muestra imágenes del efecto de los fármacos sobre las mamíferas ya formadas. Con ello, el tratamiento combinado fue el más efectivo para reducir el número de esferas. Todas las condiciones de tratamiento fueron muy efectivas a la hora de matar las mamíferas como se vio tanto por la reducción del crecimiento de las esferas (Figura 60B) como por la disminución de las células vivas (Figura 60C).

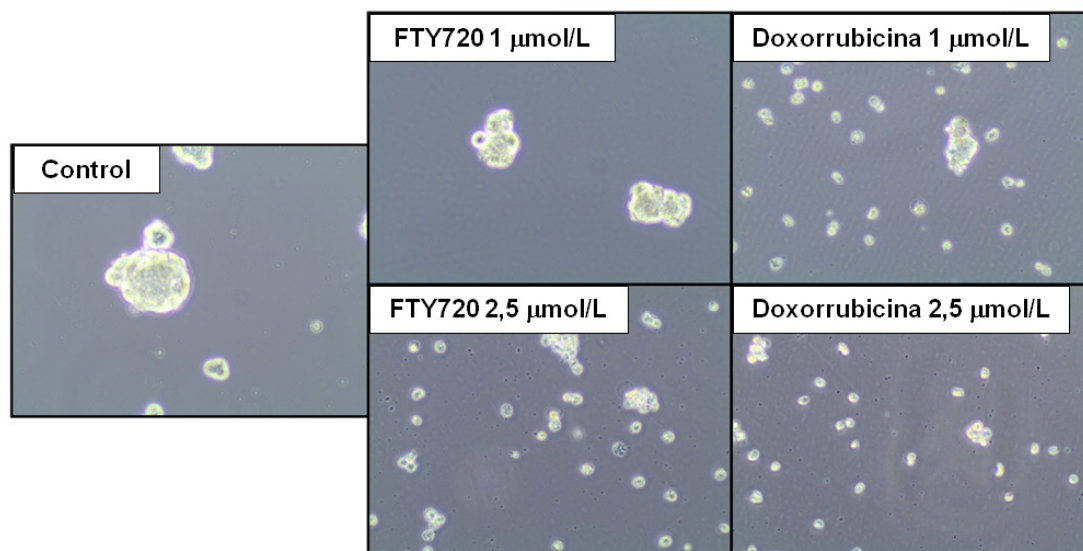


Figura 58. Formación de mamíferas frente a tratamientos. Imágenes de microscopía óptica de esferas originarias de células BT-474 formando mamíferas en presencia de las diferentes concentraciones de FTY720 y doxorubicina, durante 7 días de crecimiento y tratamiento de las mamíferas.

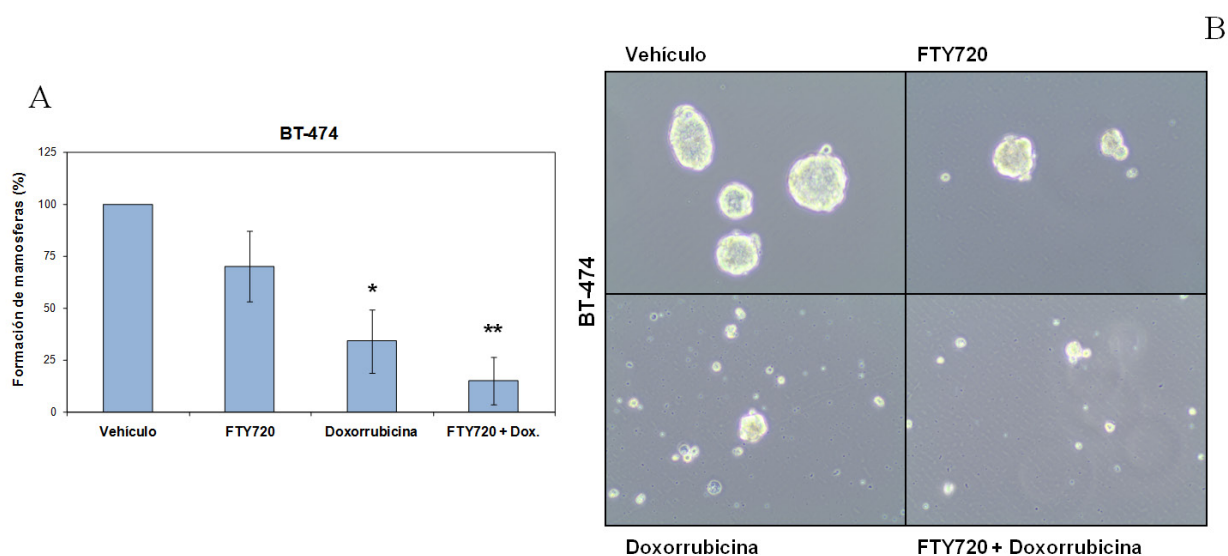


Figura 59. Formación de mamíferas frente a tratamientos. A) Cuantificación de la capacidad de formación de mamíferas de células BT-474 en presencia, desde la siembra, de FTY720 (1 µmol/L) y doxorubicina (1 µmol/L) durante 7 días de cultivo. Datos representados son medias \pm EEM de 3 experimentos. B) Imágenes de microscopía óptica de esferas originarias de células BT-474 formando mamíferas en presencia de los diferentes fármacos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

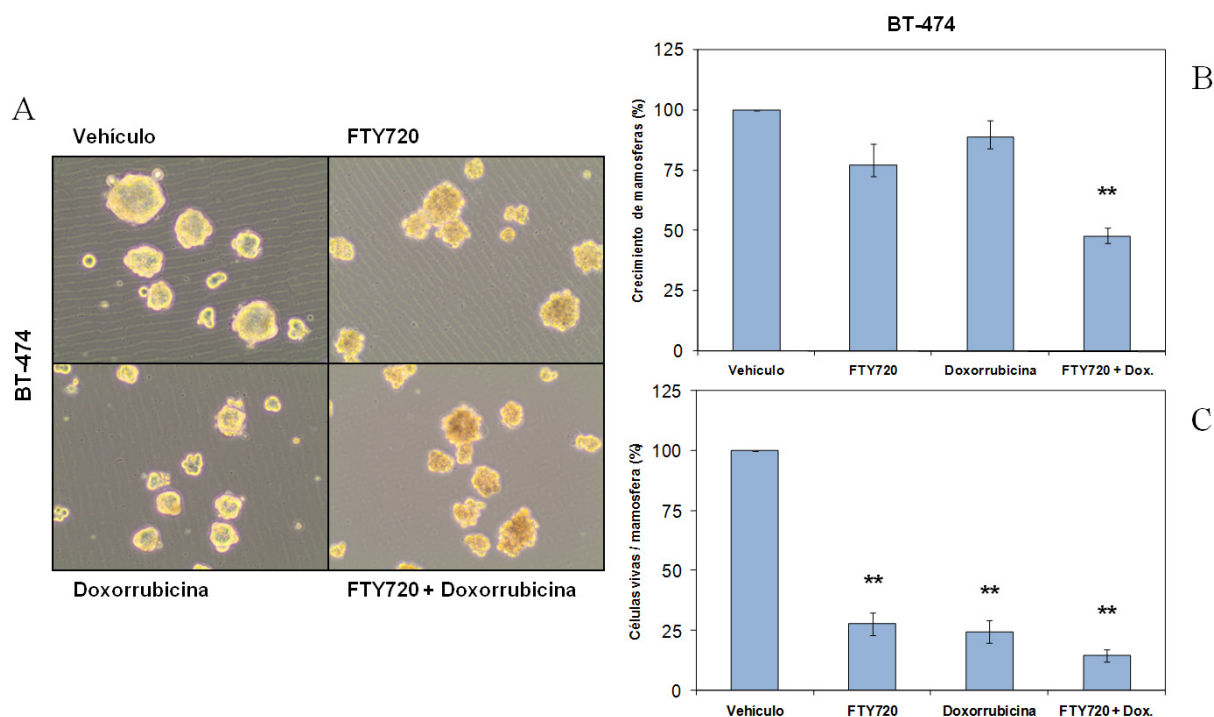


Figura 60. Tratamiento de mamosferas pre-formadas. A) Imágenes de microscopía óptica de esferas originarias de células BT-474 formando mamosferas en presencia de los diferentes fármacos. Cuantificación de la capacidad de crecimiento (B) y del número de células vivas (C) de mamosferas de células BT-474 en presencia, una vez formadas (7 días de cultivo), de FTY720 (1 $\mu\text{mol/L}$) y doxorubicina (1 $\mu\text{mol/L}$) durante 24 horas. Datos representados son medias \pm EEM de 3 experimentos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

En conclusión, estos resultados demostraron que la activación de PP2A por FTY720 mejora el efecto antitumoral de doxorubicina en células MDA-MB-231 y BT-474, incluso en células con resistencia adquirida o en mamosferas.

4.3.4. Validación *in vivo* del efecto de la activación de PP2A y el tratamiento con doxorubicina en cáncer de mama

Para validar el efecto *in vivo*, utilizamos ratones del fenotipo Balb/C con xenoinjerto ortotópico de células MDA-MB-231 previamente preparadas con matrigel. 2 semanas después, el tamaño de los tumores alcanzó el rango de tamaño 100-150 mm^3 , por lo que el modelo se consideró preparado para el comienzo de los tratamientos.

En la Figura 61 se observa la evolución temporal del tamaño de los tumores en cada uno de los grupos de tratamiento. Estos resultados mostraron una reducción significativa de los tumores tratados con un solo fármaco, tanto en el caso de FTY720 como en el caso de doxorubicina. Además, el tratamiento combinado aumentó el efecto antitumoral de doxorubicina,

lo que confirma el efecto que observamos *in vitro*. La Figura 62 muestra un panel representativo de los análisis de expresión de proteínas realizados a los tumores por inmunohistoquímica. En la línea de los resultados *in vitro*, FTY720 inhibió la expresión de CIP2A y la fosforilación de PP2A. Con respecto a SET, ninguno de los grupos de tratamiento produjo cambios en su expresión en los tumores (Figura 63). Además de estos marcadores relacionados con la inhibición de PP2A, se cuantificó por la misma técnica la expresión de las proteínas fosfohistona H3 y caspasa 3 truncada para evaluar la proliferación celular y la activación de apoptosis, respectivamente. En todos los regímenes de tratamiento, especialmente en el grupo de combinación FTY720-doxorrubicina, se cuantificó una significativa reducción de la proliferación y un significativo aumento de activación de apoptosis (Figura 63).

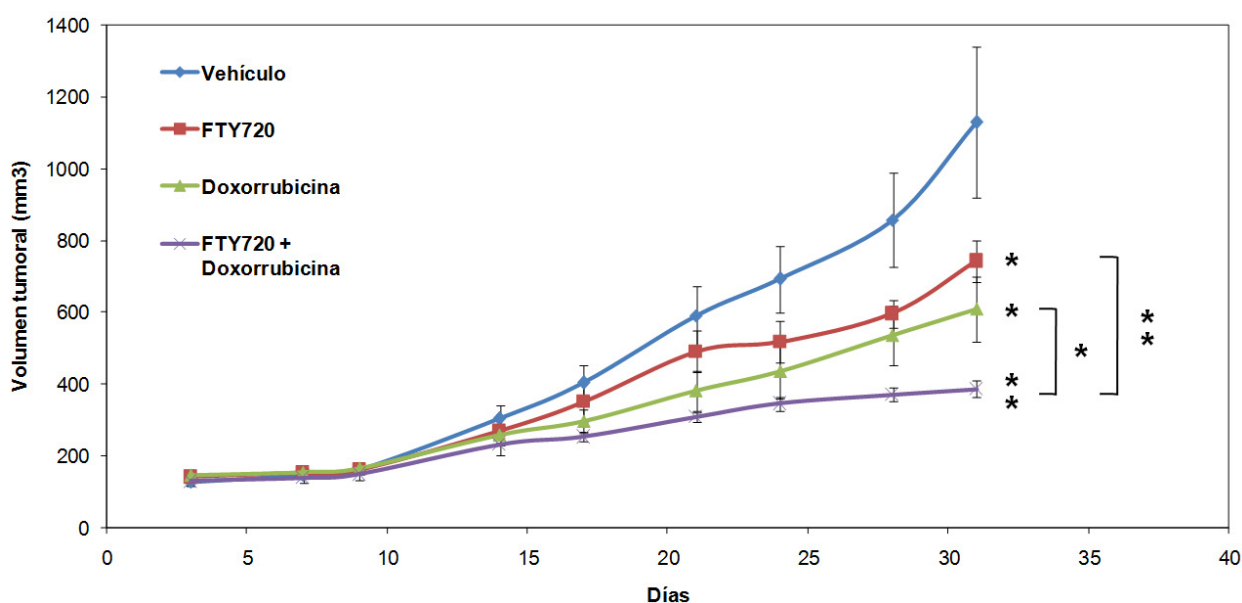


Figura 61. Análisis *in vivo* de los efectos anti-tumorales FTY720 y doxorubicina. Cuantificación del crecimiento tumoral y análisis estadístico entre el grupo control, el grupo tratado con FTY720 (10 mg/kg una vez cada dos días), el grupo tratado con doxorubicina (2 mg/kg dos veces a la semana) y el grupo tratado con la combinación de ambos agentes. Datos representados son medias \pm EEM de 10 tumores en cada grupo. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ vs control.

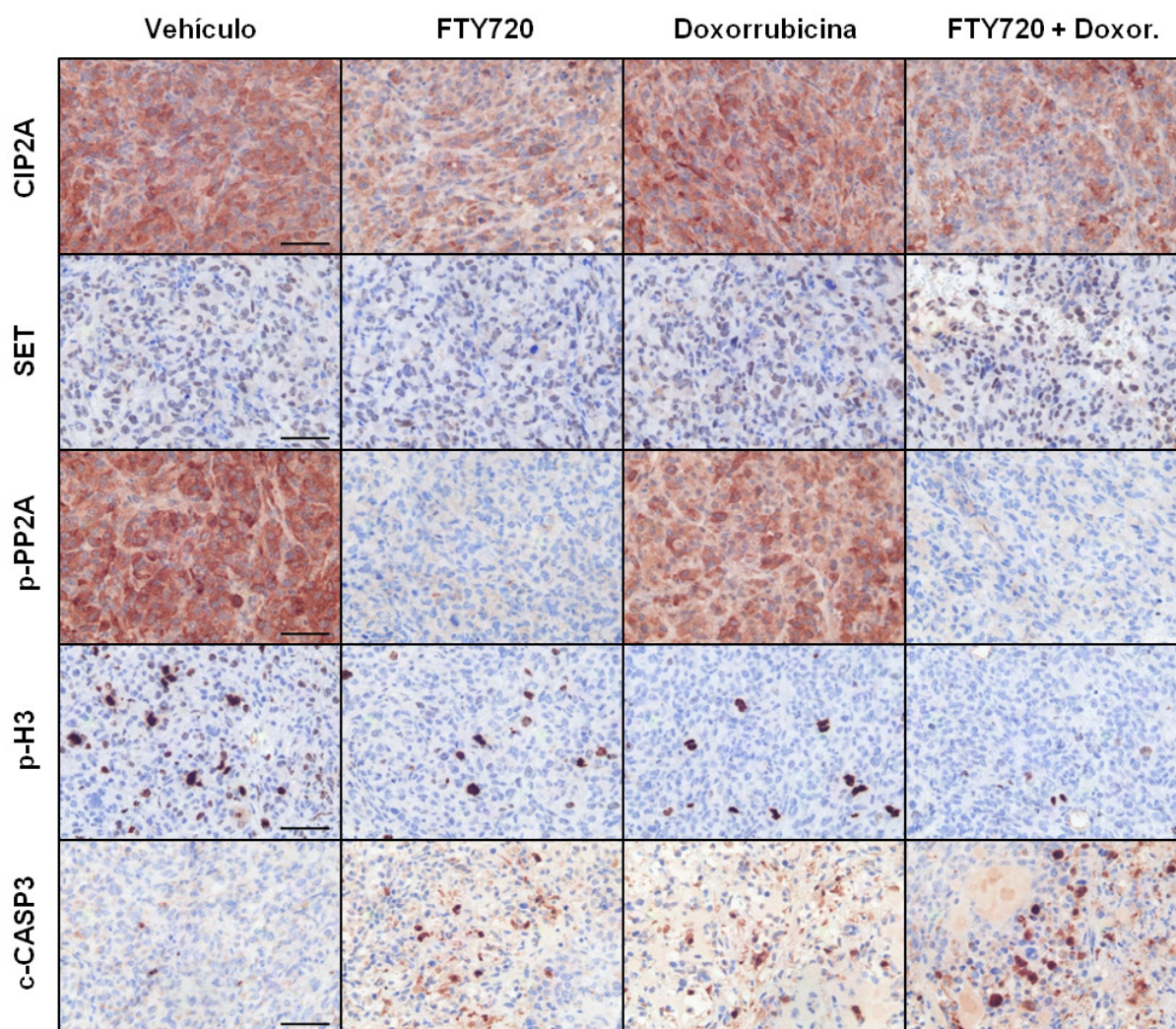


Figura 62. Análisis *in vivo* de los efectos anti-tumorales FTY720 y doxorrubicina. Panel de imágenes representativas de la detección por inmunohistoquímica de la expresión de las proteínas CIP2A, SET, p-PP2A, fosfohistona H3 y caspasa 3 truncada, en los tumores de los grupos de tratamiento del modelo *in vivo* de cáncer de mama.

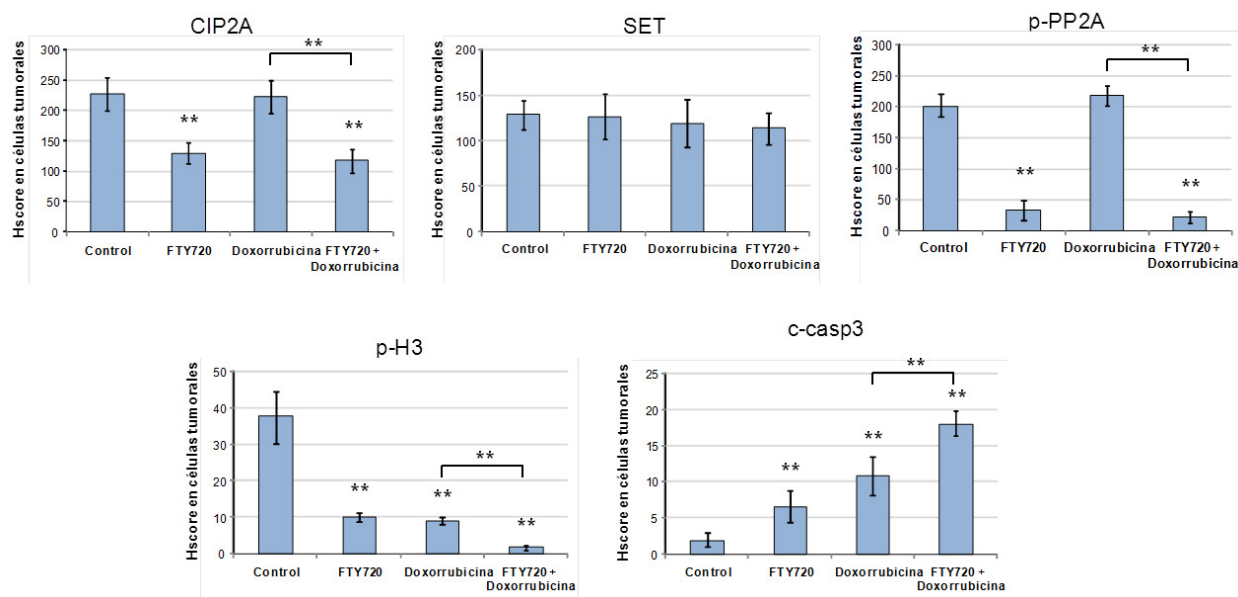


Figura 63. Análisis *in vivo* de los efectos anti-tumorales FTY720 y doxorubicina. Evaluación de la expresión diferencial, a partir del análisis inmunohistoquímico, de las proteínas CIP2A, SET, p-PP2A, p-Histona H3 y cleaved-Caspase 3, en los tumores del modelo *in vivo* de cáncer de mama. Datos representados son medias \pm EEM de 10 tumores en cada grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs control.

4.4. Significado clínico de PP2A en el cáncer de mama

4.4.1. Valor clínico de la activación PP2A en el cáncer de mama precoz tratado en adyuvancia con quimioterapia

Decidimos estudiar la posible relevancia clínica de la inhibición de PP2A en el comportamiento clínico del carcinoma de mama. Para ello, seleccionamos una cohorte de biopsias clínicas de cáncer de mama precoz, de tres centros sanitarios diferentes. Estas muestras forman un grupo de 230 pacientes de carcinoma de mama precoz tratados, tras la cirugía, con terapia adyuvante basada en antraciclinas. Las características clínicas y moleculares de estos tumores se detallan en la Tabla 10. En todas las biopsias se realizó la determinación de CIP2A, SET y p-PP2A por inmunohistoquímica. Como se puede apreciar en la Figura 64, tanto CIP2A como p-PP2A se expresaron principalmente en el citoplasma de las células tumorales, con distribución difusa dentro del tumor mamario. Para estos dos marcadores se obtuvieron tinciones débiles en células estromales (como, por ejemplo, fibroblastos, linfocitos y células endoteliales). La detección de SET por esta técnica se observó en células malignas y con localización principalmente nuclear.

Tabla 10. Características clínicas y moleculares de una cohorte de 230 biopsias de pacientes con carcinoma de mama temprano.

		No. (%)	
Edad			
	58 (26-90)		
T			
	1	113	(49,1)
	2	93	(40,4)
	3	22	(9,6)
	4	2	(0,9)
N			
	0	134	(58,3)
	1	52	(22,6)
	2	26	(11,3)
	3	18	(7,8)
Estadio			
	1	84	(36,8)
	2	101	(44,3)
	3	43	(18,9)
Grado			
	1	33	(14,3)
	2	108	(47,0)
	3	89	(38,7)
Tipo histológico			
	IDC	97	(93,3)
	ILC	6	(5,8)
	Others	1	(1,0)
ER			
	Negativo	90	(39,1)
	Positivo	140	(60,9)
PR			
	Negativo	107	(46,5)
	Positivo	123	(53,5)
HER2			
	Negativo	157	(68,3)
	Positivo	73	(31,7)
Estadio hormonal			
	Premenopáusica	59	(26,6)
	Postmenopáusica	163	(73,4)
Quimioterapia			
	Ninguna	53	(23,0)
	Adyuvante	154	(67,0)
	Neoadyuvante	23	(10,0)
Terapia hormonal			
	No	84	(38,5)
	Si	134	(134)
Recaída			
	No	158	(68,7)
	Si	72	(31,3)
Ki-67			
	Bajo	151	(65,7)
	Alto	79	(34,3)
Subtipo molecular			
	Luminal	96	(41,7)
	HER2-positivo	73	(31,7)
	Triple-negativo	61	(26,5)

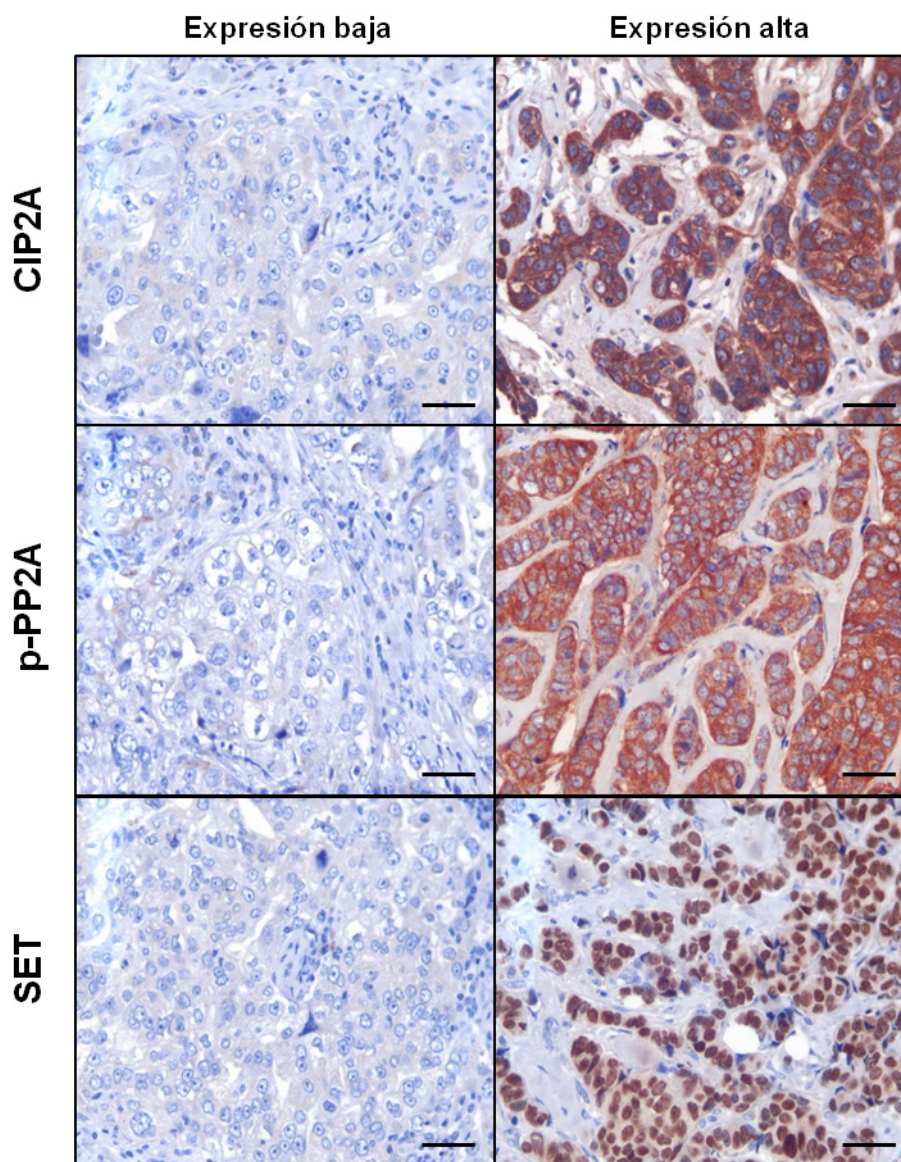


Figura 64. Significado clínico de la inhibición de PP2A en carcinoma de mama. Panel ejemplar de la detección inmunohistoquímica de CIP2A, p-PP2A y SET en biopsias de carcinoma de mama, mostrándose la expresión baja y alta de cada proteína. La línea de referencia muestra 25 μ m y el aumento es de 400x.

Se cuantificaron elevados niveles de p-PP2A en el 20% de los casos, mientras que SET y CIP2A resultaron sobreexpresados en el 13,5% y el 17,8% de los casos, respectivamente. La sobreexpresión de SET se detectó siempre en combinación con elevados niveles de p-PP2A y/o CIP2A ($p < 0,001$; solo 1 de 31 casos con sobreexpresión de SET fue negativo para p-PP2A y CIP2A) (Tabla 11). Además, en el análisis de supervivencia (por análisis de Kaplan-Meier enfrentando las determinaciones de cada marcador con los datos de supervivencia global), SET no resultó significativo en su valor pronóstico ($p = 0,085$), mientras que CIP2A ($p = 0,033$) y p-PP2A ($p = 0,010$) si obtuvieron valor pronóstico individual. Estas observaciones implicaron un cambio a la hora de analizar la fosforilación/inhibición de PP2A en células tumorales de mama, que consistió en un nuevo marcador molecular combinado, denominado “CPscore”, según el cual:

- CPscore = 0 se definió en los tumores de mama con ausencia de alteración de p-PP2A y de CIP2A.

- CPscore = 1 se definió en los tumores de mama con sobreexpresión de p-PP2A o de CIP2A.

- CPscore = 2 se definió en los tumores de mama con sobreexpresión de p-PP2A y de CIP2A.

Tabla 11. Correlación entre la determinación de SET con CIP2A y p-PP2A en la cohorte de 230 biopsias de pacientes con carcinoma de mama temprano.

	No. Casos	No. SET- (%)	No. SET+ (%)	p
SET	230	199 (86,5)	31 (13,5)	
CIP2A	230	199	31	<0,001
Negativo	189	177 (88,9)	12 (38,7)	
Positivo	41	22 (11,1)	19 (61,3)	
p-PP2A	230	199	31	<0,001
Negativo	184	176 (88,4)	8 (25,8)	
Positivo	46	23 (11,6)	23 (74,2)	

Correlacionando la determinación molecular del CPscore con las diferentes características clínicas, observamos que un valor elevado de CPscore se asociaba con el grado del tumor ($p = 0,017$), con la ausencia de la expresión de receptor de estrógenos ($p < 0,001$) y de progesterona ($p < 0,001$), y con la amplificación de HER2 ($p = 0,049$). A destacar, también cuantificamos elevado CPscore en aquellos tumores que mostraban una alta tasa de proliferación cuantificada usando el marcador Ki-67 ($p < 0,001$). También destacó el hecho de que el grupo de pacientes con valor de CPscore alto coincidió con los pacientes que padecieron algún tipo de recaída ($p < 0,001$). Para finalizar, vimos que este marcador combinado se correlacionaba positivamente con elevados niveles de fosforilación de AKT ($p < 0,001$) y ERK ($p < 0,001$). Todas las asociaciones entre el valor de CPscore y los parámetros clínicos y moleculares de esta cohorte de 230 pacientes están recogidas en la Tabla 12.

Tabla 12. Correlación de la inhibición de PP2A con los parámetros moleculares y clínicos en la cohorte de 230 biopsias de pacientes de carcinoma de mama temprano. IDC: carcinoma ductal invasivo; ILC: carcinoma lobulillar invasivo; ER: receptor de estrógenos; PR: receptor de progesterona.

	No. Casos	No. CPscore 0 (%)	No. CPscore 1 (%)	No. CPscore 2 (%)	p
CPscore	230	168 (73,0)	37 (16,1)	25 (10,9)	
T	230	168	37	25	0,552
1	113	83 (49,4)	19 (51,4)	11 (44,0)	
2	93	65 (38,7)	16 (43,2)	12 (48,0)	
3	22	19 (11,3)	1 (2,7)	2 (8,0)	
4	2	1 (0,6)	1 (2,7)	0 (0,0)	
N	230	168	37	25	0,077
0	134	104 (61,9)	17 (45,9)	13 (52,0)	
1	52	31 (18,5)	14 (37,8)	7 (28,0)	
2	26	22 (13,1)	3 (8,1)	1 (4,0)	
3	18	11 (6,5)	3 (8,1)	4 (16,0)	
Estadio	228	167	37	24	0,168
1	84	68 (40,7)	9 (24,3)	7 (29,2)	
2	101	66 (39,5)	21 (56,8)	14 (58,3)	
3	43	33 (19,8)	7 (18,9)	3 (12,5)	
Grado	230	168	37	25	0,017
1	33	29 (17,3)	1 (2,7)	3 (12,0)	
2	108	84 (50,0)	14 (37,8)	10 (40,0)	
3	89	55 (32,7)	22 (59,5)	12 (48,0)	
Tipo histológico	104	83	15	6	0,754
IDC	97	76 (91,6)	15 (100,0)	6 (100,0)	
ILC	6	6 (7,2)	0 (0,0)	0 (0)	
Others	1	1 (1,2)	0 (0,0)	0 (0)	
ER	230	168	37	25	<0,001
Negativo	90	52 (31,0)	18 (48,6)	20 (80,0)	
Positivo	140	116 (69,0)	19 (51,4)	5 (20,0)	
PR	230	168	37	25	<0,001
Negativo	107	65 (38,7)	20 (54,1)	22 (88,0)	
Positivo	123	103 (61,3)	17 (45,9)	3 (12,0)	
HER2	230	168	37	25	0,049
Negativo	157	121 (72,0)	24 (64,9)	12 (48,0)	
Positivo	73	47 (28,0)	13 (35,1)	13 (52,0)	
Estadio hormonal	222	161	36	25	0,115
Premenopáusica	59	41 (25,5)	14 (38,9)	4 (16,0)	
Postmenopáusica	163	120 (74,5)	22 (61,1)	21 (84,0)	
Recaída	230	168	37	25	<0,001
No	158	126 (75,0)	23 (62,2)	9 (36,0)	
Si	72	42 (25,0)	14 (37,8)	16 (64,0)	
Ki-67	230	168	37	25	<0,001
Bajo	151	123 (73,2)	14 (37,8)	14 (56,0)	
Alto	79	45 (26,8)	23 (62,2)	11 (44,0)	
p-ERK	211	152	34	25	<0,001
No	150	134 (88,2)	12 (35,3)	4 (16,0)	
Si	61	18 (11,8)	22 (64,7)	21 (84,0)	
p-AKT	220	161	34	25	<0,001
No	147	128 (79,5)	16 (47,1)	3 (12,0)	
Si	73	33 (20,5)	18 (52,9)	22 (88,0)	

El subgrupo de pacientes con elevado CPscore mostró una supervivencia global ($p = 0,006$) y una supervivencia libre de enfermedad ($p = 0,003$) sustancialmente menores (Figuras 65A y 65B). Así, el análisis multivariante de Cox demostró que en los carcinomas de mama tratados en adyuvancia, el valor de CPscore funcionaba como un factor adverso asociado con la supervivencia global (HR 1,8; 95% CI, 1,2-2,7; $p = 0,003$) (Tabla 13) y la supervivencia libre de enfermedad (HR 1,8; 95% CI, 1,2-2,7; $p = 0,002$) (Tabla 14) en el cáncer de mama precoz, con independencia del resto de parámetros utilizados en el diagnóstico de este tipo de cáncer.

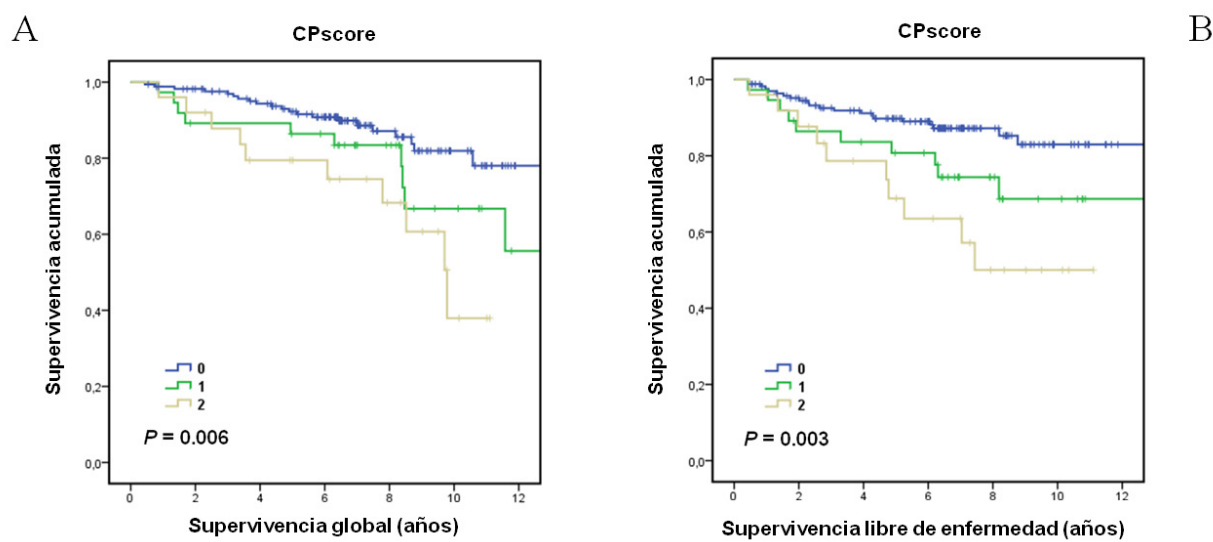


Figura 65. Significado clínico de la inhibición de PP2A en carcinoma de mama. Análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia global (A) y la supervivencia libre de enfermedad (B) en la cohorte de 230 pacientes de carcinoma de mama.

Tabla 13. Análisis univariante y multivariante de Cox de la supervivencia global en la cohorte de 230 pacientes de carcinoma de mama.

	Análisis Univariante				Análisis Multivariante			
	HR	95% CI		Significancia	HR	95% CI		Significancia
Estadio				0,003				0,909
	1,000				1,000			
	1,951	1,262	to 3,017		0,958	0,463	to 1,985	
Grado				0,029				0,115
	1,000				1,000			
	1,742	1,060	to 2,864		1,565	0,896	to 2,732	
T				0,001				0,115
	1,000				1,000			
	1,938	1,297	to 2,897		1,637	0,887	to 3,022	
N				<0,001				0,055
	1,000				1,000			
	1,656	1,270	to 2,160		1,379	0,993	to 1,915	
Subtipo molecular				0,813				0,327
	1,000				1,000			
	1,047	0,717	to 1,528		0,808	0,528	to 1,237	
CPscore				0,003				0,003
	1,000				1,000			
	1,768	1,221	to 2,560		1,830	1,234	to 2,716	

Tabla 14. Análisis univariante y multivariante de Cox de la supervivencia libre de enfermedad en la cohorte de 230 pacientes de carcinoma de mama.

	Análisis Univariante				Análisis Multivariante			
	HR	95% CI		Significancia	HR	95% CI		Significancia
Estadio				0,001				0,691
	1,000				1,000			
	2,009	1,305	to 3,094		0,858	0,405	to 1,820	
Grado				0,029				0,209
	1,000				1,000			
	1,729	1,059	to 2,825		1,406	0,826	to 2,395	
T				0,001				0,060
	1,000				1,000			
	1,999	1,347	to 2,967		1,789	0,976	to 3,277	
N				<0,001				0,022
	1,000				1,000			
	1,727	1,324	to 2,253		1,489	1,060	to 2,092	
CPscore				0,001				0,002
	1,000				1,000			
	1,849	1,281	to 2,667		1,817	1,245	to 2,653	

4.4.2. Valor clínico de la activación de PP2A en el cáncer de mama local avanzado tratado en neoadyuvancia con quimioterapia

Para validar la hipótesis de que la inhibición de PP2A no solamente es un evento frecuente en el carcinoma de mama precoz, sino que su detección es capaz de determinar la respuesta a doxorrubicina, determinamos el valor de CPscore en una serie independiente de 35 pacientes con carcinoma de mama local avanzado tratadas con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas. Las características de estas pacientes están recogidas en la Tabla 15. El tiempo medio transcurrido desde la biopsia diagnosticada hasta el comienzo de la quimioterapia fue de 20,5 días (rango 1-47 días). Durante ese periodo de tiempo, las pacientes fueron sometidas a una estadificación tumoral clínica y radiológica estándar. Posteriormente, recibieron una media de 4 ciclos de quimioterapia neoadyuvante (rango 2-6 ciclos). Tras la recuperación de los efectos derivados de la quimioterapia, las pacientes fueron sometidos a cirugía. El tiempo medio transcurrido entre la dosis final de quimioterapia y la obtención de la biopsia post-quimioterapia proveniente de la cirugía, fue de 31,2 días (rango 7-61 días).

De las 35 pacientes, 9 (25,7%) lograron una pCR tras la evaluación histopatológica de la biopsia post-quimioterapia. Como hecho destacado, observamos que la determinación del CPscore correlacionaba negativamente con la respuesta patológica ($p = 0,009$) (Tabla 16). Estos datos proporcionan una sólida relación entre la resistencia del cáncer de mama a doxorrubicina y la inhibición/fosforilación de PP2A.

Tabla 16. CPscore en pacientes de carcinoma de mama localmente avanzado que fueron tratados con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas.

	CPscore		
	0	1	2
Muestras previas a quimioterapia (n=35)	(n=19)	(n=6)	(n=10)
Respuesta patológica completa	8	0	1
No respuesta patológica completa	11	6	9
Índice de respuesta global	36,8%	0%	10%
Valor de P (0 vs 1 + 2)		0,009	

Tabla 15. Características clínicas y moleculares de 35 pacientes con carcinoma de mama local avanzado que recibieron quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas.

		No. (%)	
Edad			
	59 (30-77)		
T			
	2	5	(14,3)
	3	30	(85,7)
N			
	0	29	(82,9)
	1	5	(14,2)
	2	1	(2,9)
Grado			
	1	3	(8,6)
	2	24	(68,5)
	3	8	(22,9)
Tipo histológico			
	IDC	34	(97,1)
	ILC	1	(2,9)
ER			
	Negative	7	(20,0)
	Positive	28	(80,0)
PR			
	Negative	6	(17,1)
	Positive	29	(82,9)
HER2			
	Negative	35	(100)
	Positive	0	0
Estadio hormonal			
	Premenopáusica	6	(17,1)
	Postmenopáusica	29	(82,9)
Ki-67			
	Bajo	26	(74,3)
	Alto	9	(25,7)
Régimen de quimioterapia neoadyuvante			
	Basado en antraciclinas	35	(100)
Respuesta patológica			
	Respuesta completa	9	(25,7)

4.4.3. Valor clínico de la activación de PP2A en tratamiento *ex vivo* de cáncer de mama precoz con doxorubicina

Finalmente, realizamos la determinación del CPscore en 25 biopsias en fresco de carcinoma de mama tratadas *ex vivo* con doxorubicina. Tras el tratamiento, las biopsias fueron fijadas en formol y embebidas en parafina y, posteriormente, fueron cuantificadas por inmunohistoquímica para determinar p-PP2A y CIP2A, además de las proteínas fosfohistona H3 y caspasa 3 truncada para cuantificar los cambios en la proliferación celular y la activación de la apoptosis, respectivamente. Los resultados mostraron que el valor de CPscore se correlacionaba con el estado de proliferación ($p = 0,001$) y con la activación de apoptosis ($p = 0,003$) (Figura 66). Estos datos confirman el valor clínico potencial de la determinación de la inhibición de PP2A como marcador de progresión del carcinoma de mama y como marcador de beneficio clínico en tratamiento con doxorubicina.

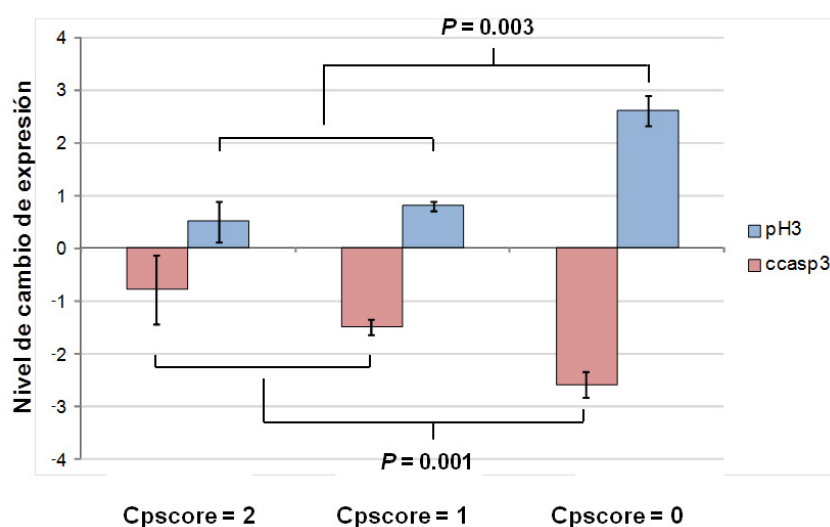


Figura 66. Significado clínico del CPscore en biopsias tratadas con doxorubicina. Correlación entre el CPscore, fosfohistona H3 (pH3) y caspasa 3 truncada (ccasp3) en 25 biopsias en fresco de cáncer de mama tratadas *ex vivo* con doxorubicina. Datos representados son medias \pm EEM de los valores Hscore para cada marcador.

DISCUSIÓN

5.1. Significado molecular y clínico de la sobreexpresión de MKP-1 en el carcinoma de mama

Numerosos estudios han señalado que la fosfatasa MKP-1 actúa como una oncoproteína en la tumorigénesis del cáncer de mama y han descrito su papel en quimiorresistencia y su posible valor pronóstico en el diagnóstico clínico de esta enfermedad [150, 151, 153]. Previamente a este proyecto de tesis, nuestro grupo comprobó que doxorrubicina era capaz de inhibir esta proteína fosfatasa, con la consecuente activación por fosforilación de las MAPK ERK1/2 y JNK1/2. Sin embargo, cuando la expresión de MKP-1 era muy elevada, no se observaba este efecto de la antraciclina, ni en el modelo *in vitro* ni en los tratamientos *ex vivo* [153].

Las diferentes condiciones de tratamiento con quimioterapia de células MDA-MB-231 y BT-474 sobreexpresando la enzima MKP-1 que hemos llevado a cabo en nuestra investigación han demostrado que los tratamientos con doxorrubicina y docetaxel son menos eficaces en células con elevada expresión de MKP-1. Así, la sobreexpresión de esta proteína produjo un claro efecto inhibitorio por defosforilación en la quinasa JNK1/2, impidiendo el efecto antiproliferativo y proapoptótico de los fármacos doxorrubicina y docetaxel. Clínicamente, evidenciamos que la expresión de MKP-1 supone un evento frecuente en nuestra cohorte clínica de carcinoma de mama precoz (31% de las pacientes cuantificadas) y determinante de la respuesta patológica de pacientes con carcinoma de mama local avanzado tratadas en neoadyuvancia con taxanos. La defosforilación de JNK1/2 sería, por tanto, la acción enzimática principal ejercida por esta fosfatasa para promover la supervivencia tumoral frente a la quimioterapia adyuvante (80% de los tumores con elevada expresión de MKP-1). Además, las pacientes con elevada expresión de MKP-1 mostraron, tras el régimen adyuvante basado en antraciclinas, una evolución clínica significativamente peor. Así, demostramos el valor pronóstico independiente y predictivo de respuesta a quimioterapia de la sobreexpresión de MKP-1 y, en consecuencia, su influencia en la disminución de la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad en estas pacientes.

Gracias a muchos años de investigaciones moleculares y translacionales de otros grupos, conocemos con bastante detalle los niveles de expresión génica y de proteínas que MKP-1 es capaz de alcanzar, en diversos tipos de cáncer y en otras enfermedades [154]. Esta fosfatasa de especificidad dual específica de MAPK se expresa, de hecho, de manera ubicua en un gran número de tejidos del organismo y puede ser inducida por muy diferentes estímulos, como factores de crecimiento, estrés oxidativo, daño químico, hipoxia u hormonas [145]. Uno de los papeles más relevantes de MKP-1 fuera del contexto tumoral se descubrió en la inflamación mediada por TNF, donde los glucocorticoides realizan una protección frente a versiones patológicas de este tipo de inflamaciones con la mediación de la defosforilación de JNK2 ejercida por MKP-1 [195].

La capacidad funcional de MKP-1 a la hora de defosforilar las MAPK p38, JNK y ERK en este orden de afinidad [147] parece depender precisamente de la estimulación celular específica que active su expresión. Además, las propias MAPK son capaces de controlar también la expresión de MKP-1 a través de bucles regulatorios complejos que aún no se conocen con total claridad [144, 196].

En el cáncer de mama, MKP-1 actúa sobre una u otra MAPK, según el estudio revisado. En numerosas ocasiones, se ha descrito la defosforilación de ERK1/2 con el fin de inhibir efectos antitumorales frente a diversos tratamientos [148, 149, 197]. Otros trabajos han destacado la defosforilación de JNK1/2 inducida por MKP-1 como el principal evento molecular de respuesta en tratamientos de cáncer de mama [151, 198, 199]. Nuestros resultados muestran claramente que, cuando inducimos la sobreexpresión de MKP-1 en células de carcinoma de mama, observamos la defosforilación de JNK1/2. De hecho, verificamos que una fosforilación de JNK1/2 inducida por agente específico entorpecía el efecto protumoral ejercido por la sobreexpresión de MKP-1 en respuesta a la quimioterapia. En comparación con resultados previos de otros grupos, debemos considerar que la capacidad de MKP-1 para modular estas quinasas podría ser muy dependiente del estímulo externo específico, hecho que podría superar cualquier patrón de afinidad predefinido a la hora de que esta fosfatasa defosforile una u otra quinasa de estas vías de señalización. De hecho, también es conocida la modulación de la MAPK p38 ejercida por MKP-1 en el tumor mamario [200].

La defosforilación de JNK1/2 por MKP-1 se analizó en la mayoría de las biopsias de carcinoma mamario precoz. Así, los tumores que sobreexpresaban MKP-1 mostraron, a su vez, bajos niveles de p-JNK1/2. Sin embargo, un 20% de los tumores con sobreexpresión de la MKP-1 presentaron niveles de expresión de p-JNK1/2 bastante elevados. En general, aunque niveles elevados de expresión de MKP-1 se correlacionan con la defosforilación de JNK1/2 tanto en cáncer de mama [151, 201] como en otros tipos de cáncer [202-204], en ocasiones la activación de JNK1/2 por fosforilación promueve la tumorigénesis. En estos casos, la activación de JNK activa el oncogén Ras, y esto se ha demostrado en ciertos tumores humanos, incluidos tumores mamarios positivos para HER2 [205]. Además, modelos de cáncer de mama mutados en la caseína quinasa 1ε mostraron una activación de la vía Wnt/Rac1/JNK/AP1, en lugar de la vía canónica Wnt/β-catenina, que producía un aumento en la capacidad de invasión y agresividad [206]. Asimismo, otro estudio demostró que la interleuquina-33 provocaba la transformación de las células epiteliales y la tumorigénesis mamaria a través de la activación de MEK-ERK, JNK-cJun y STAT3 [207]. Finalmente, un reciente trabajo basado en un modelo murino con inactivación genética de JNK2 demostró la capacidad de esta proteína para mediar la transición epitelio-mesénquima y promover la progresión tumoral; gracias a su habilidad para limitar las poblaciones celulares luminales en

tejido mamario sano y tumoral, con independencia de la expresión de p53 [208]. Por consiguiente, la proteína JNK es capaz de promover efectos anti o protumorales en diferentes tipos celulares y estadios tumorales, incluyendo los tumores de mama [209].

Las antraciclinas, y más recientemente los taxanos, se vienen incluyendo en los esquemas de quimioterapia adyuvante y neoadyuvante del cáncer de mama. Los resultados previos de nuestro grupo demostraron la inhibición ejercida por doxorubicina en la expresión de MKP-1, tanto en líneas celulares de carcinoma de mama como en biopsias de tumores de este tipo de cáncer, con la consecuente activación tanto de ERK1/2 como de JNK1/2 [153]. Los taxanos, a diferencia de las antraciclinas, componen una familia de agentes químicos cuya respuesta molecular en las células tumorales tratadas ha ido encaminada a la modulación de vías de señalización que desembocan en el control de los microtúbulos y el proceso de mitosis, más que en las vías de las MAPK [69, 210]. Nuestros resultados mostraron que tanto docetaxel como doxorubicina alteran MKP-1, ERK1/2 y JNK1/2, además de que la sobreexpresión inducida de MKP-1 en las líneas celulares de cáncer de mama inhibió el efecto antitumoral de ambos fármacos.

Los experimentos realizados han demostrado que líneas celulares de cáncer de mama con sobreexpresión de MKP-1 son más difíciles de tratar con los fármacos doxorubicina y docetaxel. La capacidad de MKP-1 para generar resistencia frente a quimioterapia en células de carcinoma de mama no es un hecho científico de reciente descubrimiento. Previamente, varios trabajos han señalado a esta fosfatasa como posible molécula mediadora de resistencia tumoral. Entre ellos, destaca el trabajo realizado en el laboratorio de Small y colaboradores, donde comprobaron que diferentes líneas celulares de cáncer de mama incrementaban su viabilidad celular frente a diferentes agentes tras inducir la sobreexpresión de MKP-1 en las mismas [151]. Los resultados en nuestro modelo de sobreexpresión de MKP-1 confirmaron cierto nivel de quimiorresistencia a los tratamientos, mediados por la defosforilación de JNK1/2. Además, la elevada expresión de MKP-1 en tumores de pacientes podría tener consecuencias clínicas, ya que los resultados de predicción de beneficio frente a la quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas y la neoadyuvante basada en taxanos destacan una menor eficacia terapéutica de estos fármacos a la hora de erradicar las células tumorales en esas pacientes.

Aunque MKP-1 es la fosfatasa de MAPK más estudiada en cáncer, no es la única proteína de este grupo relacionada con este tipo de enfermedad. De hecho, MKP-2 es una proteína con un enorme potencial como supresor tumoral del cáncer de mama, ya que muy bajos niveles de su expresión se correlacionaron con tumores de mama de subtipo basal con un destacado nivel de proliferación tumoral (por vía Ras-ERK activada) en respuesta a quimioterapia neoadyuvante basada en taxanos [211]. Además, posteriores estudios de MKP-2 en cáncer de mama mostraron la importancia de su inhibición para promover el fenotipo stem a través de las vías controladas por

ERK1/2 y JNK1/2 [212]. Incluso se ha asociado su expresión con la sensibilidad a tamoxifeno en células de carcinoma de mama [213]. Y con respecto a MKP-3, se sabe que su expresión correlaciona con la sensibilidad de células de carcinoma de mama al inhibidor de MEK1 y MEK2 GSK1120212 [214]; además de ser una de las fosfatasa activadas en tumores de mama ER- tras análisis del fosfatoma de los mismos [215]. Por lo tanto, las principales MKPs han demostrado un enorme potencial a la hora de entender la tumorigénesis del cáncer de mama y la respuesta de sus células a muy diversos tratamientos. Futuros estudios continuarán esclareciendo la implicación de estas proteínas en el carcinoma mamario.

A pesar de que los experimentos y cuantificaciones para determinar el significado molecular y clínico de MKP-1 en cáncer de mama los hemos planteado en tratamientos con quimioterapia, numerosos trabajos científicos han tratado de relacionar la expresión de esta enzima con otro tipo de tratamientos en modelos de esta enfermedad. Así, un estudio mostró que el tratamiento de células MDA-MB-231 con inhibidores de proteasoma producía una inactivación de ERK1/2 ejercida por MKP-1 [198]. Además, el pretratamiento de modelos animales subcutáneos con células MDA-MB-231 con antagonistas del receptor de glucocorticoides previamente al tratamiento con dexametasona/paclitaxel; provocaron mayor citotoxicidad en paralelo a la inhibición de la expresión de MKP-1 [216]. Incluso un trabajo reciente demostró que la activación de la expresión de MKP-1 y la inhibición de MAPK se producían como consecuencia de la respuesta al tratamiento en pacientes con cáncer de mama con statinas, unos fármacos que disminuyen los niveles de colesterol [217]. Finalmente, la expresión de esta fosfatasa junto con su localización mitocondrial se correlacionaron con la resistencia a terapia anti-HER2 en tumores de mama HER2 positivos [199].

Además de lo publicado en cáncer de mama, la expresión y actividad de MKP-1 también ha sido relacionada con otros tipos tumorales. En cáncer de pulmón no microcítico, MKP-1 demostró un claro papel en procesos de angiogénesis, invasión y metástasis [202] y fue responsable de la resistencia de este tipo de tumor al tratamiento con gefitinib [218]. Asimismo, la inhibición de MKP-1 activó las vías controladas por JNK1/2 y p38 y aumentó la quimiosensibilidad de células de cáncer pancreático a gemcitabina [219].

En resumen, nuestros resultados destacan el hecho de que la sobreexpresión de MKP-1 es un evento crucial con relevancia, tanto molecular como clínica, en el carcinoma de mama.

5.2. Significado molecular y clínico de la inhibición de PP2A en el carcinoma de mama.

Varios estudios han asociado previamente el complejo enzimático PP2A con la función supresora tumoral en diversos tipos de cáncer, regulando vías de señalización clave para la tumorigénesis [158, 159]. Nuestros resultados han mostrado que la inhibición funcional de PP2A es un evento frecuente en el carcinoma mamario, identificando *in vitro* e *in vivo* dos mecanismos moleculares de inhibición de esta enzima que cooperan entre ellos: la hiperfosforilación de PP2A y la sobreexpresión de las proteínas SET y CIP2A. Además, la determinación molecular de la inhibición de PP2A se asoció a peor beneficio clínico de pacientes con carcinoma de mama precoz y local avanzado [220].

Aunque ya existen publicaciones acerca de la posible relevancia de la inactivación de PP2A en el cáncer de mama, su significado clínico y molecular está pendiente de ser esclarecido. Se conocen determinadas alteraciones génicas inactivadoras del complejo funcional PP2A [165, 166, 221, 222], aunque su prevalencia es baja. A pesar de ello, debería evaluarse la posible contribución del estatus mutacional de PP2A a la reducida actividad de PP2A observada en células tumorales de mama. De esta forma, podríamos aclarar cómo contribuyem la hiperfosforilación de PP2A, la sobreexpresión de SET y/o CIP2A y las mutaciones inhibitorias del complejo enzimático a la inhibición de PP2A en esta enfermedad.

En este sentido, una investigación publicada en 2014 demostró la ausencia de mutaciones de PP2A tras analizar líneas celulares de cáncer de mama y de otros tipos tumorales. Además, estos autores estudiaron bases de datos disponibles (cBioPortal) y concluyeron que la activación de PP2A podría encontrarse desregulada en más del 50% de los tumores de cáncer de mama, debido a alteraciones en subunidades del complejo enzimático o a la inhibición endógena ejercida por proteínas como SETBP1 (proteína de unión a SET), SET o CIP2A [223]. A la vista de este tipo de datos, se entiende que la capacidad funcional de cada inhibidor endógeno de PP2A, por sí solo o en cooperación con otros inhibidores o eventos moleculares desreguladores de esta fosfatasa, ha de ser aclarada.

Con respecto a los inhibidores endógenos de PP2A, varios trabajos han descrito la posible relevancia de CIP2A en la tumorigénesis de mama [170, 224]. En nuestros modelos, observamos una reducida actividad de PP2A en varias líneas celulares, a la par que la hiperfosforilación de PP2A junto a la sobreexpresión de SET y CIP2A en todos los tipos celulares. Supusimos, por tanto, que estos tres eventos moleculares podrían estar actuando como mecanismos cooperativos a la hora de inhibir PP2A en las líneas celulares de carcinoma de mama.

Para estudiar la modulación de la actividad de PP2A y su posible regulación por los inhibidores CIP2A y SET, empleamos el fármaco FTY720. Este fármaco es un inmunosupresor aprobado por la FDA para su uso en el tratamiento de la esclerosis múltiple que además está demostrando efectos preclínicos relevantes en varios tipos de cáncer humano [162, 225, 226]. En nuestros experimentos hemos evaluado el potencial farmacológico de FTY720 como activador de PP2A, observando una inhibición significativa del crecimiento celular y una inducción de la apoptosis. Además, sugerimos que los efectos antitumorales mediados por FTY720 dependen de la activación de PP2A, ya que el pretratamiento con el inhibidor fosfatasa OA en condiciones específicas para inhibir la actividad fosfatasa de PP2A restableció casi por completo los efectos provocados por FTY720. Todos estos resultados concuerdan con los efectos antitumorales mediados por FTY720 previamente descritos [173, 223, 227] y con los efectos antiproliferativos sin restauración completa de la viabilidad celular en la combinatoria FTY720 + OA [163, 226]. Por lo tanto, nuestras observaciones unidas a las de otros estudios sugieren que agentes activadores de PP2A como FTY720 muestran un elevado potencial en el tratamiento del carcinoma mamario [193]. Además del efecto antiproliferativo demostrado por FTY720, analizamos su combinación con doxorrubicina. En estos tratamientos, se demostró que los efectos antitumorales de doxorrubicina en las células de carcinoma de mama se incrementaban tras la activación de PP2A inducida por el inmunosupresor FTY720.

Este dato sugiere la posibilidad de que FTY720 revertiese resistencias de células tumorales de mama a doxorrubicina. Por un lado, tratamos con este régimen farmacológico tanto clones de células MDA-MB-231 resistentes a la antraciclina como mamóferas obtenidas a partir de células BT-474 creciendo en condiciones stem, y en ambos casos comprobamos que el tratamiento combinado resultaba el más efectivo. Además, tratamos *ex vivo* biopsias en fresco de tumores de mama con doxorrubicina y se observó que el valor del CPscore correlacionaba con mayor proliferación y menor activación de apoptosis. Finalmente, en un grupo independiente de biopsias de pacientes de cáncer de mama tratadas en neoadyuvancia con doxorrubicina, se estudió la correlación del CPscore con la respuesta, y se observó la ausencia de respuesta patológica completa con valores altos de CPscore. En conjunto, estos datos sugieren que la activación inducida de PP2A en células de carcinoma de mama sería potencialmente útil a la hora de superar cierta quimiorresistencia a doxorrubicina.

Como venimos discutiendo, nuestros datos demuestran una conexión entre el efecto de FTY720 activando PP2A y reduciendo los niveles de p-PP2A y CIP2A en las líneas celulares de cáncer de mama. En consecuencia, el efecto potenciador de la sensibilidad a doxorrubicina ejercido por FTY720 podría ocurrir a través de la regulación negativa de CIP2A. En este sentido, se ha publicado la capacidad de CIP2A para modular la sensibilidad de células tumorales de mama frente

a bortezomib y doxorrubicina [168, 169]. En paralelo, otros efectos moleculares ejercidos por este activador de PP2A fueron la defosforilación de ERK1/2 y AKT, reforzando el efecto antiproliferativo ya cuantificado en los ensayos de viabilidad celular. Además, las determinaciones de estas proteínas en las biopsias tumorales de mama se correlacionaron con el CPscore, de manera que valores altos de inhibición de PP2A se asociaban con la expresión elevada de p-ERK1/2 y p-AKT.

En la línea de la expresión de estos inhibidores de PP2A en células tumorales de mama, un relevante estudio de 2014 mostró que tanto CIP2A como SET se sobreexpresan frecuentemente junto a c-MYC en líneas celulares de cáncer de mama [228]. Además, estos autores disminuyeron el potencial tumorigénico de estas células tumorales de mama utilizando un nuevo inhibidor de SET (OP449), proponiéndolo como la mejor estrategia terapéutica para activar PP2A al ser capaz de incidir post-traduccionamente en c-MYC [228]. En cambio, nosotros hemos comprobado que la profunda inhibición que FTY720 ejerce en los inhibidores endógenos CIP2A y SET y en la hiperfosforilación de PP2A ocasiona un efecto antitumoral teóricamente mayor en las células tumorales de mama. Además, este fármaco también inhibió la expresión de c-MYC, tanto solo como en combinación con doxorrubicina. Se sabe que FTY720 puede inhibir la interacción SET-PP2A [229], pero no modula la expresión de SET y por ello no cuantificamos cambios de expresión por western blotting. Además, comprobamos por PCR cuantitativa que el efecto del inmunosupresor en CIP2A y en p-PP2A es post-traduccional.

Con respecto a las muestras de pacientes, se han detectado elevados niveles de p-PP2A en estadios tardíos de la progresión del carcinoma de mama [230] y se han asociado los niveles de CIP2A con la agresividad tumoral de este tipo de cáncer [224]. Un trabajo de 2014 mostró que el estradiol (hormona esteroidea) producía un aumento en la expresión de CIP2A, mostrándose mayores niveles de este inhibidor endógeno de CIP2A en tejidos mamarios positivos para ER que en los negativos [231]. Este resultado va en la línea de nuestra cuantificación clínica de la inhibición de PP2A, ya que el análisis de nuestra cohorte de muestras tumorales mostró una correlación significativa entre la determinación del CPscore y la expresión de ER ($p < 0,001$).

Con respecto a los tumores HER2 positivos, demostramos una correlación entre la inhibición de PP2A y el receptor. Estos resultados son consistentes con un trabajo previo en el cual se describe la modulación positiva de la vía de señalización controlada por HER2 a la hora de hiperfosforilar PP2A [230]. Sin embargo, la asociación entre p-PP2A y HER2 en nuestro grupo de pacientes fue baja ($p = 0,056$), incluso más que la asociación entre CIP2A y HER2 ($p = 0,049$), lo cual puede explicarse por un bucle de regulación bidireccional entre PP2A y HER2. Esta influencia molecular entre la proteína fosfatasa y el receptor tirosina quinasa en los tumores de mama requieren nuevos estudios para clarificarla.

Finalmente, el estudio de la inhibición de PP2A en las 230 biopsias de nuestra cohorte de pacientes mostró un enorme potencial clínico, ya que elevados valores de CPscore se correlacionaron con peor supervivencia (tanto global como libre de enfermedad) tras la quimioterapia adyuvante. Así, esta determinación molecular apoya las nuevas posibilidades terapéuticas para tratar el cáncer de mama con un agente de amplio espectro como FTY720. De todas formas, estos resultados preclínicos requieren de estudios prospectivos enfocados hacia cohortes de pacientes mayores y clasificadas por cada subtipo biológico para normalizar los resultados. La realización de futuros estudios en este sentido permitirá valorar si la frecuencia que ha mostrado la inhibición de PP2A tiene, definitivamente, un impacto clínico real.

5.3. Valor pronóstico y predictivo de las fosfatasa MKP-1 y PP2A en el carcinoma de mama humano.

El carcinoma de mama es una enfermedad molecularmente heterogénea, por lo que los estudios dirigidos a la mejora de su diagnóstico y tratamiento han tenido que incorporar a sus líneas de investigación y objetivos nuevas plataformas tecnológicas de búsquedas masivas que han incrementado considerablemente el número de biomarcadores candidatos [232] y las posibilidades de tratamiento de la enfermedad [11]. Estos biomarcadores tienen que ser validados con evidencias experimentales suficientes para permitir su traslación a la clínica [33].

El presente proyecto de investigación ha evidenciado que la sobreexpresión de MKP-1 y la inhibición de PP2A son dos eventos lo suficientemente importantes como para considerarse claves en la progresión tumoral del carcinoma de mama.

En el caso de MKP-1, su sobreexpresión determinó un peor pronóstico y predicción de beneficio clínico en pacientes con carcinomas de mama precoces tratadas con quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas. Además, esta determinación molecular predijo peor respuesta a tratamiento en las pacientes con carcinomas locales avanzados analizadas, ya que mostraron elevada expresión de MKP-1 en las biopsias de los tumores que no alcanzaron una respuesta patológica completa tras la quimioterapia neoadyuvante basada en taxanos.

En el caso del complejo heterotrimérico PP2A, la determinación de su inhibición reveló un grupo de tumores de carcinomas de mama precoces que sí mostró peor respuesta a la terapia adyuvante basada en antraciclinas. Además, esta determinación sí se correlacionó con la respuesta patológica completa de pacientes de cáncer de mama local avanzado tratados en neoadyuvancia con quimioterapia basada también en antraciclinas.

Frente a estos resultados, se plantea la cuestión de si MKP-1 y PP2A podrían ser considerados como potenciales biomarcadores para el diagnóstico del carcinoma de mama. Para ello, y sin olvidar que toda la experimentación realizada en el presente trabajo se engloba dentro de la categoría de “estudio preclínico”, vamos a tratar de encuadrar las evidencias experimentales y clínicas obtenidas con las propiedades que un biomarcador debe poseer para ser considerado como tal en la evaluación, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de mama.

Como discutimos previamente, el modelo *in vitro* demostró que las células tumorales de mama con sobreexpresión inducida de MKP-1 adquieren una capacidad tumorigénica mayor que las células parentales, incluso frente a la quimioterapia. Además, esa respuesta reforzada frente a los tratamientos se explicó mediante el mecanismo específico de defosforilación de JNK1/2, una MAPK

principalmente asociada a respuestas al estrés [209]. La determinación de MKP-1 y p-JNK1/2 se realizó, inicialmente, en un total de 350 biopsias de tumores de carcinoma de mama precoz tratados con quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas. El 31% de estos tumores presentaron elevada expresión de MKP-1 y, dentro de los mismos, la mayoría mostraron un bajo nivel de expresión de p-JNK1/2 (80%). No es de extrañar que algunos tumores con elevada expresión de MKP-1 muestren, a su vez, activación de JNK1/2, ya que hay datos publicados en los que se asoció la elevada expresión de JNK2 con peor supervivencia libre de enfermedad en tumores de subtipo basal [233]. En comparación con diferentes parámetros clínicos, destaca el hecho de que la mayoría de los tumores con sobreexpresión de MKP-1 sufrieron algún tipo de recaída ($p < 0,001$), además de que la supervivencia de los mismos fue significativamente menor ($p < 0,001$ para la supervivencia global; $p < 0,001$ para la supervivencia libre de enfermedad). Y un último dato, proveniente del análisis multivariante del parámetro “expresión de MKP-1” en comparación con otros parámetros y utilizando el modelo de riesgo proporcional de Cox, fue que la sobreexpresión de MKP-1 en nuestro grupo de pacientes se comportaba como un factor de riesgo frente al tumor con independencia de parámetros clínicos ya establecidos en el diagnóstico de esta enfermedad. Este dato es muy relevante, ya que significa que la expresión de MKP-1 contiene un valor pronóstico y predictivo de beneficio clínico independiente para determinar tumores de comportamiento más agresivo en pacientes de mama tratados con quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas. Además, los tumores con elevada expresión de MKP-1 que mostraron una baja expresión de p-JNK1/2 corresponden al subgrupo de pacientes que peor respondieron al régimen adyuvante. En este sentido, es importante destacar que este valor pronóstico contiene datos de asociación significativos con respecto a la predicción no sólo de la superación del cáncer de mama en las pacientes, sino también de la posible reaparición de la enfermedad y del beneficio clínico de la quimioterapia que recibirán posteriormente.

Otras MKPs también han demostrado capacidad para determinar la capacidad tumorigénica de los tumores de mama y su posible evolución clínica. La expresión génica de MKP-2 se encontró inhibida en carcinomas de alto grado en comparación con los de bajo grado, adquiriendo la función de supresor tumoral que posteriormente se ha consolidado en el cáncer de mama [234]. De hecho, la pérdida de MKP-2 se asoció al incremento de la recaída de la enfermedad y a la disminución de la supervivencia total de pacientes con carcinoma de mama triple negativo [235]. Además, la sobreexpresión de la proteína MKP-3 se asoció con resistencia de pacientes de mama a tratamiento con tamoxifeno, con la implicación de las vías controladas por ERK1/2 y JNK1/2 [236]. Así, la importancia de estas fosfatasa en el seguimiento clínico de las pacientes con esta enfermedad es lo suficientemente elevada como para insistir en futuros estudios traslacionales en este sentido.

La capacidad como biomarcador pronóstico de MKP-1 no está ligada, a la vista de nuestros resultados, a subtipos biológicos concretos del cáncer de mama. Este punto debería ser validado con estudios prospectivos de grupos de pacientes más extensos para cada subtipo molecular de esta enfermedad. Especialmente, el grupo de los tumores triple negativos, que actualmente carece de terapias dirigidas, tendría que ser de los primeros en utilizarse para comprobar y validar la posible utilidad de la cuantificación de MKP-1 como biomarcador pronóstico y predictivo de respuesta a quimioterapia.

A modo de validación, realizamos la determinación de MKP-1 y p-JNK1/2 en un grupo independiente de 64 biopsias de carcinomas de mama local avanzado tras la quimioterapia neoadyuvante basada en taxanos. La determinación molecular de ambas proteínas se correlacionó significativamente con los tumores en los que no se alcanzó la respuesta patológica completa ($p = 0,008$), que es el parámetro clínico utilizado en la quimioterapia neoadyuvante como estándar de supervivencia a la enfermedad. De esta forma, obtuvimos un dato relevante de posible predicción de respuesta directa y beneficio clínico por tratamientos con docetaxel en cáncer de mama asociado a la específica determinación de MKP-1 junto a p-JNK1/2. Además, estos tumores suelen tratarse en neoadyuvancia previamente a la cirugía por su mayor agresividad y complejidad tumorigénica, y se sabe que la angiogénesis inducida por hipoxia en el carcinoma de mama regula la expresión de varios genes, entre los que se validó el gen que codifica para MKP-1 para desarrollar la posterior metástasis ósea [237].

Dada la importancia que tiene MKP-1 en varios contextos tumorales y en otro tipo de enfermedades por su rol oncológico, se han planteado diferentes aproximaciones para tratar de inhibir su expresión con el uso de agentes inhibidores, como el uso de inhibidores mas o menos específicos (sanguinarina, benzofurano, TPI-3...) o el uso de moduladores de su expresión génica (triptolide, tristetrapolina, CC-5079...) [238]. El gran obstáculo para que una terapia anti-MKP-1 resulte clínicamente efectiva es el hecho de que esta enzima se expresa de manera ubicua en numerosos tipos de células, tejidos y órganos del ser humano [154], por lo que para dirigirlos específicamente a las células tumorales de mama se requeriría quizás el uso de algún tipo de vector farmacológico. De todas formas, el verdadero beneficio clínico de una posible inhibición molecular de MKP-1 en el carcinoma de mama debería demostrarse previamente a posibles estudios más farmacocinéticos.

Otro grupo distinto de muestras de carcinoma de mama fue utilizado para cuantificar, por inmunohistoquímica, la expresión de la forma hiperfosforilada de PP2A y sus inhibidores endógenos CIP2A y SET. Esta cohorte clínica estuvo compuesta por 230 tumores de pacientes con carcinoma de mama precoz tratadas en adyuvancia con quimioterapia basada en antraciclinas. El

20% de los tumores presentaron altos niveles de p-PP2A, el 14% mostraron elevados niveles de SET y el 18%, altos niveles de expresión de CIP2A. Ya que la elevada expresión de SET coincidió casi totalmente con la expresión tanto de CIP2A como de p-PP2A (97% de los casos) pero sin que SET resultara significativo, se estableció un parámetro denominado CPscore que combinara los valores de expresión de CIP2A y p-PP2A. Este parámetro se evaluó estadísticamente por comparación con el resto de parámetros clínicos de los pacientes. Se encontró que los tumores con elevado valor de CPscore sí pertenecían a pacientes que sufrían recaída de la enfermedad ($p < 0,001$). Además, el CPscore elevado determinó peor supervivencia global ($p = 0,006$) y peor supervivencia libre de enfermedad ($p = 0,003$), y el análisis multivariante del CPscore utilizando el modelo de riesgo proporcional de Cox resultó en que la inhibición de PP2A se comporta como un factor adverso frente a esta enfermedad con independencia de parámetros implantados en el diagnóstico del cáncer de mama. En este sentido, la inhibición de PP2A tendría un enorme potencial para predecir tanto el progreso de las pacientes frente al tumor como las posibilidades de reaparición del mismo. El valor pronóstico y predictivo de beneficio clínico de la inhibición de PP2A en el carcinoma de mama resulta novedoso, ya que aunque se ha estudiado bastante en tumores sólidos en los últimos años, nunca se le había concedido valor diagnóstico en la tumorigénesis mamaria.

La relación entre la inhibición de PP2A y la expresión de SET en los tumores de nuestras pacientes de cáncer de mama fue relevante, pero no significativa a la hora de asociarse con el resto de parámetros clínicos y moleculares analizados. Otros estudios han demostrado la importancia de la inhibición de PP2A ejercida por SET en el cáncer de mama [228], pero también en otros tipos de cáncer. La inhibición de SET con FTY720 en líneas celulares y tumores de carcinoma de colon metastásico demostraron que la sobreexpresión de este inhibidor, asociada a la inhibición de PP2A, determina peor supervivencia clínica de estos pacientes [239]. Además, la nuevamente sobreexpresión de SET en cáncer de pulmón no microcítico se asoció a la progresión tumoral y a un peor pronóstico de los pacientes [240]. Futuros estudios con cohortes de tumores de carcinoma de mama más amplias y con mayor representación de cada subtipo molecular podrían esclarecer el verdadero potencial de SET como biomarcador de esta enfermedad, tanto a nivel pronóstico como predictivo de beneficio tras el régimen terapéutico.

Con la intención de estudiar el posible efecto de la inhibición de PP2A en la resistencia a tumores de mama a terapias basadas en antraciclinas, desarrollamos y confirmamos en un modelo *in vivo* el potencial farmacológico que tendría plantear un tratamiento combinado entre doxorubicina y un activador de PP2A como FTY720. Además, validamos el valor de CPscore en un grupo independiente de 35 pacientes con cáncer de mama localmente avanzado que recibieron quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas. En estos tumores, la inhibición de PP2A correlacionaba negativamente con la respuesta patológica ($p = 0,009$). Teniendo en cuenta

que el 75% de estas pacientes no respondieron a la neoadyuvancia al no alcanzar la respuesta patológica completa, la inhibición de PP2A cobra importancia como valor pronóstico y predictivo de respuesta, además de abrir la puerta a regímenes terapéuticos en los que se combine quimioterapia con activadores del complejo enzimático PP2A como FTY720 para superar posibles resistencias y mejorar el beneficio clínico frente a la quimioterapia y la supervivencia a la enfermedad.

Al igual que MKP-1, PP2A es una proteína que desempeña un papel básico en la fisiología de las células humanas de cualquier tejido [155]. En la tumorigénesis mamaria, sin embargo, esta fosfatasa tiene una función de supresor tumoral, y así en las células tumorales aparece inhibida. Por lo tanto, el uso de agentes activadores de PP2A como FTY720 sería clínicamente más sencillo de incorporar a las terapias antitumorales que en el caso de MKP-1, ya que la actividad basal de PP2A en las células normales del organismo es muy considerable respecto a la inhibición de la misma en posibles células tumorales de mama.

MKP-1 y PP2A participan en vías de señalización dirigidas a la modulación de la proliferación celular [154, 159] y a la actividad de p53 a la hora de responder al daño al ADN celular [241, 242]. En este contexto, una excelente revisión publicada por Junttila MR y colaboradores puso de manifiesto las enormes posibilidades de interconexión entre el control ejercido en las vías MAPK por fosfatasas PSPs como PP2A y PTPs como MKP-1, a la hora de ejecutar señales de estrés apoptótico para inhibir la proliferación y activar vías de apoptosis [243]. Por todo ello, la posible interacción funcional entre las proteínas PP2A y MKP-1 a la hora de modular la señalización celular, tanto en un contexto de célula normal como de célula tumoral podría ser muy interesante y debería ser estudiada en profundidad. Además, MKP-1 y PP2A se han correlacionado con la expresión de HER2 en el carcinoma mamario [199, 230], lo cual se corresponde en parte con nuestra validación clínica en el caso de PP2A (sin significancia estadística), aunque no así en el caso de MKP-1.

Investigaciones acerca de la influencia molecular de las proteínas fosfatasas en el cáncer de mama como la aquí discutida tienen una enorme importancia. La proteína PTPN12 ha demostrado ser fundamental en la transformación tumoral de células mamarias humanas, ya que el reestablecimiento de su expresión inhibió la capacidad proliferativa y metastásica de células tumorales de mama del subtipo molecular triple negativo [244]. La proteína supresora tumoral PTEN, básica en numerosos tipos de cáncer, apareció inhibida por mutación en el 28% de las casi 300 pacientes de carcinoma de mama invasivo analizadas en un relevante estudio integrado sobre las mutaciones del cáncer de mama relacionadas con la vía PI3K [245]. Finalmente, se demostró que la proteína POPX2 (un miembro de la familia de las PP2C) lideraba la regulación de la capacidad invasiva de células de carcinoma de mama [246]. Así, las líneas de investigación de las diferentes

proteínas fosfatasas que existen en el cáncer de mama deben continuar su progreso, ya que seguirán apareciendo candidatos de las dos superfamilias con relevantes papeles en la tumorigénesis y la progresión de esta enfermedad.

Como discutimos anteriormente, son fundamentales validaciones preclínicas con grupos extensos de pacientes de cada subtipo biológico para valorar si las determinaciones moleculares de MKP-1 y PP2A podrían servir como biomarcadores para pronosticar la evolución clínica de los tumores mamarios y/o predecir la respuesta a la quimioterapia. En cualquier caso, nuestro trabajo ha puesto de relieve el potencial de estas dos fosfatasas en el diagnóstico clínico y en la previsión de la posible respuesta terapéutica de los tumores de mama y, por tanto, del beneficio clínico. En consecuencia, demostramos que no sólo debemos prestar atención a las quinasas, sino que no podemos olvidar la capacidad pro o antitumoral de las fosfatasas para alterar la señalización celular durante la progresión tumoral.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, llegamos a las siguientes conclusiones:

1. Los fármacos docetaxel y doxorubicina producen *in vitro* la activación de las MAPK ERK1/2 y JNK1/2 en diferentes modelos celulares, asociándose a una reducción de la fosfatasa MKP-1.

2. La sobreexpresión de la fosfatasa MKP-1 inducida en líneas celulares de cáncer de mama se asocia a quimioresistencia, incrementando la viabilidad celular y reduciendo la activación de apoptosis frente a docetaxel y doxorubicina.

3. La expresión de la fosfatasa MKP-1 regula la activación de JNK1/2 en los modelos celulares de cáncer de mama, induciendo su defosforilación. Este nivel de activación regulado por la expresión de MKP-1 se revela como el factor mediador de la quimioresistencia a doxorubicina y docetaxel en estos modelos.

4. La sobreexpresión de MKP-1 en cáncer de mama precoz se asocia significativamente y de forma independiente a un menor beneficio a la quimioterapia adyuvante y neoadyuvante, en términos de supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y respuesta patológica completa. La inactivación de JNK1/2 regulada por esta sobreexpresión de MKP-1 determina el fenotipo de tumores con peor respuesta a la terapia sistémica en estas pacientes.

5. La fosfatasa PP2A se demuestra inhibida *in vitro* en los subtipos moleculares intrínsecos de cáncer de mama. La activación de PP2A está regulada por CIP2A y SET, así como por la hiperfosforilación de esta fosfatasa.

6. Esta inhibición de la fosfatasa PP2A en todos los modelos celulares estudiados de cáncer de mama se asocia a una resistencia al fármaco doxorrubicina. La inhibición de PP2A analizada en biopsias de cáncer de mama humano tratadas *ex vivo* con doxorrubicina determina el efecto antitumoral de este tratamiento, asociándose con una menor reducción de la proliferación y un menor aumento de la apoptosis en las células tumorales en exposición a este fármaco.

7. La activación de la fosfatasa PP2A por FTY720 incrementa el efecto citotóxico de doxorrubicina y revierte cierta resistencia a este fármaco en el modelo celular de cáncer de mama. En los modelos murinos de cáncer de mama triple negativo estudiados, FTY720 también aumenta el efecto antitumoral de la doxorrubicina, reduciendo la proliferación tumoral e incrementando la apoptosis de forma significativa.

8. La permanencia de la inhibición de PP2A (hiperfosforilación de PP2A y sobreexpresión de CIP2A y SET) en cáncer de mama precoz se asocia significativamente y de forma independiente a un menor beneficio a la quimioterapia adyuvante y neoadyuvante en términos de supervivencia global, supervivencia libre de enfermedad y respuesta patológica completa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Malvezzi M, Bertuccio P, Rosso T, Rota M, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Ann Oncol*. 2015; 26(4):779-786.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics*, 2015. *CA Cancer J Clin*. 65(1):5-29.
3. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, Cardoso F. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013; 24 Suppl 6:vi7-23.
4. McTiernan A. Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified? *Oncologist*. 2003; 8(4):326-334.
5. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th Edition. *Springer*. 2010.
6. Lakhani SR, Ellis I, Schnitt S, PH T, van de Vijver M. *WHO Classification of Tumours of the Breast*. 4th Edition. *IARC Press*. 2012.
7. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*. 1988; 319(9):525-532.
8. Lakhani SR. The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol*. 1999; 187(3):272-278.
9. Shackney SE, Silverman JF. Molecular evolutionary patterns in breast cancer. *Adv Anat Pathol*. 2003; 10(5):278-290.
10. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol*. 2005; 205(2):248-254.
11. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406(6797):747-752.
12. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(19):10869-10874.

13. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown PO, Borresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(14):8418-8423.
14. Chin K, DeVries S, Fridly J, Spellman PT, Roydasgupta R, Kuo WL, Lapuk A, Neve RM, Qian Z, Ryder T, Chen F, Feiler H, Tokuyasu T, Kingsley C, Dairkee S, Meng Z, et al. Genomic, transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell*. 2006; 10(6):529-541.
15. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009; 27(8):1160-1167.
16. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical , clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(16):5367-5374.
17. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B , Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 22(8):1736-1747.
18. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011; 5(1):5-23.
19. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models, human breast tumors. *Genome Biol*. 2007; 8(5):R76.
20. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 12(5):R68.
21. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*. 16 Suppl 1:61-70.
22. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietersenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011; 121(7):2750-2767.

23. Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med*. 2009; 15(8):842-844.
24. Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *Nature*. 2008; 452(7187):548-552.
25. Chin L, Gray JW. Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature*. 2008; 452(7187):553-563.
26. van't Veer LJ, Bernards R. Enabling personalized cancer medicine through analysis of gene-expression patterns. *Nature*. 2008; 452(7187):564-570.
27. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351(8):781-791.
28. Rothe F, Laes JF, Lambrechts D, Smeets D, Vincent D, Maetens M, Fumagalli D, Michiels S, Drisis S, Moerman C, Detiffe JP, Larsimont D, Awada A, Piccart M, Sotiriou C, Ignatiadis M. Plasma circulating tumor DNA as an alternative to metastatic biopsies for mutational analysis in breast cancer. *Ann Oncol*. 25(10):1959-1965.
29. Hanash SM, Pitteri SJ, Faca VM. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature*. 2008; 452(7187):571-579.
30. Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*. 2008; 452(7187):580-589.
31. Potti A, Schilsky RL, Nevins JR. Refocusing the war on cancer: the critical role of personalized treatment. *Sci Transl Med*. 2010; 2(28):28cm13.
32. de Bono JS, Ashworth A. Translating cancer research into targeted therapeutics. *Nature*. 2010; 467(7315):543-549.
33. Kelloff GJ, Sigman CC. Cancer biomarkers: selecting the right drug for the right patient. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 11(3):201-214.
34. Welboren WJ, Stunnenberg HG, Sweep FC, Span PN. Identifying estrogen receptor target genes. *Mol Oncol*. 2007; 1(2):138-143.
35. Romano A, Adriaens M, Kuenen S, Delvoux B, Dunselman G, Evelo C, Groothuis P. Identification of novel ER-alpha target genes in breast cancer cells: gene-, cell-selective co-regulator recruitment at target promoters determines the response to 17beta-estradiol and tamoxifen. *Mol Cell Endocrinol*. 314(1):90-100.
36. Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Decker DA, Hortobagyi GN. Use of tamoxifen for breast cancer: twenty-eight years later. *J Clin Oncol*. 1995; 13(2):513-529.

37. Conneely OM, Jericevic BM, Lydon JP. Progesterone receptors in mammary gl, development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2003; 8(2):205-214.
38. Osborne CK, Yochmowitz MG, Knight WA, 3rd, McGuire WL. The value of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancer. *Cancer*. 1980; 46(12 Suppl):2884-2888.
39. Nishimukai A, Yagi T, Yanai A, Miyagawa Y, Enomoto Y, Murase K, Imamura M, Takatsuka Y, Sakita I, Hatada T, Miyoshi Y. High Ki-67 Expression, Low Progesterone Receptor Expression Could Independently Lead to a Worse Prognosis for Postmenopausal Patients With Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2015; 15(3):204-11.
40. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2(2):127-137.
41. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987; 235(4785):177-182.
42. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989; 244(4905):707-712.
43. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor, breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist*. 2009; 14(4):320-368.
44. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23(28):7212-7220.
45. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, A'Hern R, Salter J, Detre S, Hills M, Walsh G. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007; 99(2):167-170.
46. Cuzick J, Dowsett M, Pineda S, Wale C, Salter J, Quinn E, Zabaglo L, Mallon E, Green AR, Ellis IO, Howell A, Buzdar AU, Forbes JF. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the Genomic Health recurrence score in early breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29(32):4273-4278.
47. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med*. 2009; 360(8):790-800.

48. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002; 415(6871):530-536.
49. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351(27):2817-2826.
50. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, Vickery T, Davies SR, Snider J, Stijleman IJ, Reed J, Cheang MC, Mardis ER, Perou CM, Bernard PS, Ellis MJ. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 16(21):5222-5232.
51. Cheang MC, Voduc KD, Tu D, Jiang S, Leung S, Chia SK, Shepherd LE, Levine MN, Pritchard KI, Davies S, Stijleman IJ, Davis C, Ebbert MT, Parker JS, Ellis MJ, Bernard PS, et al. Responsiveness of intrinsic subtypes to adjuvant anthracycline substitution in the NCIC CTG MA.5 randomized trial. *Clin Cancer Res*. 2012; 18(8):2402-2412.
52. Ellis MJ, Suman VJ, Hoog J, Lin L, Snider J, Prat A, Parker JS, Luo J, DeSchryver K, Allred DC, Esserman LJ, Unzeitig GW, Margenthaler J, Babiera GV, Marcom PK, Guenther JM, et al. Randomized phase II neoadjuvant comparison between letrozole, anastrozole, and exemestane for postmenopausal women with estrogen receptor-rich stage 2 to 3 breast cancer: clinical and biomarker outcomes and predictive value of the baseline PAM50-based intrinsic subtype--ACOSOG Z1031. *J Clin Oncol*. 2011; 29(17):2342-2349.
53. Chia SK, Bramwell VH, Tu D, Shepherd LE, Jiang S, Vickery T, Mardis E, Leung S, Ung K, Pritchard KI, Parker JS, Bernard PS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res*. 2012; 18(16):4465-4472.
54. Esserman LJ, Berry DA, Cheang MC, Yau C, Perou CM, Carey L, DeMichele A, Gray JW, Conway-Dorsey K, Lenburg ME, Buxton MB, Davis SE, van't Veer LJ, Hudis C, Chin K, Wolf D, et al. Chemotherapy response and recurrence-free survival in neoadjuvant breast cancer depends on biomarker profiles: results from the I-SPY 1 TRIAL (CALGB 150007/150012; ACRIN 6657). *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 132(3):1049-1062.

55. Prat A, Bianchini G, Thomas M, Belousov A, Cheang MC, Koehler A, Gomez P, Semiglazov V, Eiermann W, Tjulandin S, Byakhov M, Bermejo B, Zambetti M, Vazquez F, Gianni L, Baselga J. Research-based PAM50 subtype predictor identifies higher responses and improved survival outcomes in HER2-positive breast cancer in the NOAH study. *Clin Cancer Res.* 2014; 20(2):511-521.
56. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Graf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* 2012; 486(7403):346-352.
57. The requirements of a specialist breast unit. *Eur J Cancer.* 2000; 36(18):2288-2293.
58. Morrow M. Breast conservation and negative margins: how much is enough? *Breast.* 2009; 18 Suppl 3:S84-86.
59. Morrow M. Personalizing extent of breast cancer surgery according to molecular subtypes. *Breast.* 2013; 22 Suppl 2:S106-109.
60. Mouw KW, Harris JR. Hypofractionation in the era of modulated radiotherapy (RT). *Breast.* 2013; 22 Suppl 2:S129-136.
61. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, Senn HJ. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013; 24(9):2206-2223.
62. Sedlmayer F, Zehentmayr F, Fastner G. Partial breast re-irradiation for local recurrence of breast carcinoma: Benefit and long term side effects. *Breast.* 2013; 22 Suppl 2:S141-146.
63. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D, Bryant J, Costantino JP, Geyer CE, Jr., Wickerham DL, Wolmark N. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24(23):3726-3734.
64. von Minckwitz G, Fontanella C. Selecting the neoadjuvant treatment by molecular subtype: how to maximize the benefit? *Breast.* 2013; 22 Suppl 2:S149-151.
65. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, Bonnefoi H, Cameron D, Gianni L, Valagussa P, Swain SM, Prowell T, Loibl S, Wickerham DL, Bogaerts J, Baselga J, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet.* 2014; 384(9938):164-172.

66. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol.* 2005; 205(2):275-292.
67. Coley HM. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2008; 34(4):378-390.
68. Smith L, Watson MB, O’Kane SL, Drew PJ, Lind MJ, Cawkwell L. The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(8):2115-2120.
69. De S, Cipriano R, Jackson MW, Stark GR. Overexpression of kinesins mediates docetaxel resistance in breast cancer cells. *Cancer Res.* 2009; 69(20):8035-8042.
70. Yu KD, Huang AJ, Fan L, Li WF, Shao ZM. Genetic variants in oxidative stress-related genes predict chemoresistance in primary breast cancer: a prospective observational study and validation. *Cancer Res.* 2012; 72(2):408-419.
71. De Abreu FB, Schwartz GN, Wells WA, Tsongalis GJ. Personalized therapy for breast cancer. *Clin Genet.* 2014; 86(1):62-67.
72. Fisher B, Costantino JP, Wickerham DL, Cecchini RS, Cronin WM, Robidoux A, Bevers TB, Kavanah MT, Atkins JN, Margolese RG, Runowicz CD, James JM, Ford LG, Wolmark N. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(22):1652-1662.
73. Cuzick J, Sestak I, Cawthorn S, Hamed H, Holli K, Howell A, Forbes JF. Tamoxifen for prevention of breast cancer: extended long-term follow-up of the IBIS-I breast cancer prevention trial. *Lancet Oncol.* 2015; 16(1):67-75.
74. Errico A. Breast cancer: Tamoxifen-offering a long-term prevention option. *Nat Rev Clin Oncol.* 2015; 12(2):66.
75. Goss PE, Ingle JN, Martino S, Robert NJ, Muss HB, Livingston RB, Davidson NE, Perez EA, Chavarri-Guerra Y, Cameron DA, Pritchard KI, Whelan T, Shepherd LE, Tu D. Impact of premenopausal status at breast cancer diagnosis in women entered on the placebo-controlled NCIC CTG MA17 trial of extended adjuvant letrozole. *Ann Oncol.* 2013; 24(2):355-361.
76. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol.* 1999; 17(9):2639-2648.

77. Slamon DJ, Leyl,-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001; 344(11):783-792.
78. Albanell J, Baselga J. Unraveling resistance to trastuzumab (Herceptin): insulin-like growth factor-I receptor, a new suspect. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93(24):1830-1832.
79. Argiris A, Wang CX, Whalen SG, DiGiovanna MP. Synergistic interactions between tamoxifen and trastuzumab (Herceptin). *Clin Cancer Res*. 2004; 10(4):1409-1420.
80. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, Linn SC, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Hauptmann M, Beijersbergen RL, Mills GB, van de Vijver MJ, Bernards R. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell*. 2007; 12(4):395-402.
81. Rimawi MF, Wiechmann LS, Wang YC, Huang C, Migliaccio I, Wu MF, Gutierrez C, Hilsenbeck SG, Arpino G, Massarweh S, Ward R, Soliz R, Osborne CK, Schiff R. Reduced dose and intermittent treatment with lapatinib and trastuzumab for potent blockade of the HER pathway in HER2/neu-overexpressing breast tumor xenografts. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(6):1351-1361.
82. Eroglu Z, Tagawa T, Somlo G. Human epidermal growth factor receptor family-targeted therapies in the treatment of HER2-overexpressing breast cancer. *Oncologist*. 2014; 19(2):135-150.
83. Martin M, Loibl S, von Minckwitz G, Morales S, Martinez N, Guerrero A, Anton A, Aktas B, Schoenegg W, Munoz M, Garcia-Saenz JA, Gil M, Ramos M, Margeli M, Carrasco E, Liedtke C, et al. Phase III Trial Evaluating the Addition of Bevacizumab to Endocrine Therapy As First-Line Treatment for Advanced Breast Cancer: The Letrozole/Fulvestrant and Avastin (LEA) Study. *J Clin Oncol*. 2015; 33(9):1045-52
84. Jaspers JE, Kersbergen A, Boon U, Sol W, van Deemter L, Zier SA, Drost R, Wientjens E, Ji J, Aly A, Doroshow JH, Cranston A, Martin NM, Lau A, O'Connor MJ, Ganesan S, et al. Loss of 53BP1 causes PARP inhibitor resistance in Brca1-mutated mouse mammary tumors. *Cancer Discov*. 2013; 3(1):68-81.
85. Juvekar A, Burga LN, Hu H, Lunsford EP, Ibrahim YH, Balmana J, Rajendran A, Papa A, Spencer K, Lyssiotis CA, Nardella C, Pandolfi PP, Baselga J, Scully R, Asara JM, Cantley LC, et al. Combining a PI3K inhibitor with a PARP inhibitor provides an effective therapy for BRCA1-related breast cancer. *Cancer Discov*. 2012; 2(11):1048-1063.

-
86. Jordan NJ, Dutkowski CM, Barrow D, Mottram HJ, Hutcheson IR, Nicholson RI, Guichard SM, Gee JM. Impact of dual mTORC1/2 mTOR kinase inhibitor AZD8055 on acquired endocrine resistance in breast cancer in vitro. *Breast Cancer Res.* 2014; 16(1):R12.
 87. Liu Y, Ludes-Meyers J, Zhang Y, Munoz-Medellin D, Kim HT, Lu C, Ge G, Schiff R, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Brown PH. Inhibition of AP-1 transcription factor causes blockade of multiple signal transduction pathways and inhibits breast cancer growth. *Oncogene.* 2002; 21(50):7680-7689.
 88. Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol.* 2005; 19(8):1951-1959.
 89. Schiff R, Osborne CK. Endocrinology and hormone therapy in breast cancer: new insight into estrogen receptor-alpha function and its implication for endocrine therapy resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005; 7(5):205-211.
 90. Boonyaratanakornkit V, Scott MP, Ribon V, Sherman L, Anderson SM, Maller JL, Miller WT, Edwards DP. Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases. *Mol Cell.* 2001; 8(2):269-280.
 91. Boonyaratanakornkit V, Bi Y, Rudd M, Edwards DP. The role and mechanism of progesterone receptor activation of extra-nuclear signaling pathways in regulating gene transcription and cell cycle progression. *Steroids.* 2008; 73(9-10):922-928.
 92. Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. *Mol Cell Proteomics.* 2004; 3(4):379-398.
 93. Flynn JF, Wong C, Wu JM. Anti-EGFR Therapy: Mechanism and Advances in Clinical Efficacy in Breast Cancer. *J Oncol.* 2009; 2009:526963.
 94. Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE. ErbB-1 , ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol.* 1998; 18(9):5042-5051.
 95. Soltoff SP, Cantley LC. p120cbl is a cytosolic adapter protein that associates with phosphoinositide 3-kinase in response to epidermal growth factor in PC12 and other cells. *J Biol Chem.* 1996; 271(1):563-567.
 96. Spector NL, Blackwell KL. Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27(34):5838-5847.

97. Dave B, Migliaccio I, Gutierrez MC, Wu MF, Chamness GC, Wong H, Narasanna A, Chakrabarty A, Hilsenbeck SG, Huang J, Rimawi M, Schiff R, Arteaga C, Osborne CK, Chang JC. Loss of phosphatase and tensin homolog or phosphoinositol-3 kinase activation and response to trastuzumab or lapatinib in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing locally advanced breast cancers. *J Clin Oncol*. 29(2):166-173.
98. Varjosalo M, Keskitalo S, Van Drogen A, Nurkkala H, Vichalkovski A, Aebersold R, Gstaiger M. The protein interaction landscape of the human CMGC kinase group. *Cell Rep*. 2013; 3(4):1306-1320.
99. Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*. 2007; 26(22):3279-3290.
100. Lawrence MC, Jivan A, Shao C, Duan L, Goad D, Zaganjor E, Osborne J, McGlynn K, Stippec S, Earnest S, Chen W, Cobb MH. The roles of MAPKs in disease. *Cell Res*. 2008; 18(4):436-442.
101. Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1802(4):396-405.
102. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007; 26(22):3291-3310.
103. Saini KS, Loi S, de Azambuja E, Metzger-Filho O, Saini ML, Ignatiadis M, Dancey JE, Piccart-Gebhart MJ. Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Rev*. 2013; 39(8):935-946.
104. Chappell WH, Steelman LS, Long JM, Kempf RC, Abrams SL, Franklin RA, Basecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Mazzarino MC, Nicoletti F, Libra M, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget*. 2011; 2(3):135-164.
105. Ebi H, Costa C, Faber AC, Nishtala M, Kotani H, Juric D, Della Pelle P, Song Y, Yano S, Mino-Kenudson M, Benes CH, Engelman JA. PI3K regulates MEK/ERK signaling in breast cancer via the Rac-GEF, P-Rex1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(52):21124-21129.
106. Hoeflich KP, O'Brien C, Boyd Z, Cavet G, Guerrero S, Jung K, Januario T, Savage H, Punnoose E, Truong T, Zhou W, Berry L, Murray L, Amler L, Belvin M, Friedman LS, et al. In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal-like breast cancer models. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(14):4649-4664.

107. Kurokawa H, Lenferink AE, Simpson JF, Pisacane PI, Sliwkowski MX, Forbes JT, Arteaga CL. Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res.* 2000; 60(20):5887-5894.
108. Gutierrez MC, Detre S, Johnston S, Mohsin SK, Shou J, Allred DC, Schiff R, Osborne CK, Dowsett M. Molecular changes in tamoxifen-resistant breast cancer: relationship between estrogen receptor, HER-2, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Clin Oncol.* 2005; 23(11):2469-2476.
109. Massarweh S, Osborne CK, Creighton CJ, Qin L, Tsimelzon A, Huang S, Weiss H, Rimawi M, Schiff R. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Res.* 2008; 68(3):826-833.
110. Small GW, Somasundaram S, Moore DT, Shi YY, Orlowski RZ. Repression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1 by anthracyclines contributes to their antiapoptotic activation of p44/42-MAPK. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 307(3):861-869.
111. Sui X, Kong N, Ye L, Han W, Zhou J, Zhang Q, He C, Pan H. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett.* 2014; 344(2):174-179.
112. Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol.* 2004; 15(2):177-182.
113. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet.* 2006; 7(8):606-619.
114. Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene.* 2008; 27(41):5527-5541.
115. Carpten JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlik M, Lin A, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature.* 2007; 448(7152):439-444.
116. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science.* 2004; 304(5670):554.
117. Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene.* 2008; 27(41):5497-5510.

118. Liu P, Cheng H, Santiago S, Raeder M, Zhang F, Isabella A, Yang J, Semaan DJ, Chen C, Fox EA, Gray NS, Monahan J, Schlegel R, Beroukhim R, Mills GB, Zhao JJ. Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms. *Nat Med.* 17(9):1116-1120.
119. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997; 275(5308):1943-1947.
120. Stern H, Gardner H, Burzykowski T, Elatre W, O'Brien C, Lackner MR, Pestano GA, Santiago A, Villalobos I, Eiermann W, Pienkowski T, Martin M, Robert NJ, Crown J, Nuciforo P, Bee V, et al. PTEN loss is associated with worse outcome in HER2-amplified breast cancer patients but is not associated with trastuzumab resistance. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(9):2065-74
121. O'Brien NA, Browne BC, Chow L, Wang Y, Ginther C, Arboleda J, Duffy MJ, Crown J, O'Donovan N, Slamon DJ. Activated phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling confers resistance to trastuzumab but not lapatinib. *Mol Cancer Ther.* 2010; 9(6):1489-1502.
122. Janne PA, Gray N, Settleman J. Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2009; 8(9):709-723.
123. Fedorov O, Muller S, Knapp S. The (un)targeted cancer kinome. *Nat Chem Biol.* 2010; 6(3):166-169.
124. Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev.* 1989; 53(4):450-490.
125. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5):646-674.
126. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, et al. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2007; 318(5853):1108-1113.
127. Bandyopadhyay S, Chiang CY, Srivastava J, Gersten M, White S, Bell R, Kurschner C, Martin C, Smoot M, Sahasrabudhe S, Barber DL, Ch,a SK , Ideker T. A human MAP kinase interactome. *Nat Methods.* 2010; 7(10):801-805.
128. Duncan JS, Whittle MC, Nakamura K, Abell AN, Midl, AA, Zawistowski JS, Johnson NL, Granger DA, Jordan NV, Darr DB, Usary J, Kuan PF, Smalley DM, Major B, He X, Hoadley KA, et al. Dynamic reprogramming of the kinome in response to targeted MEK inhibition in triple-negative breast cancer. *Cell.* 2012; 149(2):307-321.

-
129. Hunter T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*. 1995; 80(2):225-236.
 130. Freiss G, Vignon F. Protein tyrosine phosphatases and breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004; 52(1):9-17.
 131. Ostman A, Hellberg C, Bohmer FD. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(4):307-320.
 132. Julien SG, Dube N, Hardy S, Tremblay ML. Inside the human cancer tyrosine phosphatome. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(1):35-49.
 133. Barford D. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci*. 1996; 21(11):407-412.
 134. Zhang ZY, Zhou B, Xie L. Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. *Pharmacol Ther*. 2002; 93(2-3):307-317.
 135. Tonks NK. Redox redux: revisiting PTPs and the control of cell signaling. *Cell*. 2005; 121(5):667-670.
 136. He RJ, Yu ZH, Zhang RY, Zhang ZY. Protein tyrosine phosphatases as potential therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin*. 35(10):1227-1246.
 137. Villafranca JE, Kissinger CR, Parge HE. Protein serine/threonine phosphatases. *Curr Opin Biotechnol*. 1996; 7(4):397-402.
 138. Shi Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell*. 2009; 139(3):468-484.
 139. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Osterman A, Godzik A, Hunter T, Dixon J, Mustelin T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell*. 2004; 117(6):699-711.
 140. Keyse SM, Ginsburg M. Amino acid sequence similarity between CL100, a dual-specificity MAP kinase phosphatase and cdc25. *Trends Biochem Sci*. 1993; 18(10):377-378.
 141. Tanoue T, Yamamoto T, Nishida E. Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases. *J Biol Chem*. 2002; 277(25):22942-22949.
 142. Dickinson RJ, Keyse SM. Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J Cell Sci*. 2006; 119(Pt 22):4607-4615.
 143. Theodosiou A, Ashworth A. MAP kinase phosphatases. *Genome Biol*. 2002; 3(7):REVIEWS3009.
-

144. Amit I, Citri A, Shay T, Lu Y, Katz M, Zhang F, Tarcic G, Siwak D, Lahad J, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Vaisman N, Segal E, Rechavi G, Alon U, Mills GB, et al. A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat Genet.* 2007; 39(4):503-512.
145. Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev.* 2008; 60(3):261-310.
146. Pulido R, Hooft van Huijsduijnen R. Protein tyrosine phosphatases: dual-specificity phosphatases in health and disease. *FEBS J.* 2008; 275(5):848-866.
147. Farooq A, Zhou MM. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal.* 2004; 16(7):769-779.
148. Orlowski RZ, Small GW, Shi YY. Evidence that inhibition of p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling is a factor in proteasome inhibitor-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2002; 277(31):27864-27871.
149. Pervin S, Singh R, Freije WA, Chaudhuri G. MKP-1-induced dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase is essential for triggering nitric oxide-induced apoptosis in human breast cancer cell lines: implications in breast cancer. *Cancer Res.* 2003; 63(24):8853-8860.
150. Haagenson KK, Wu GS. The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 2010; 29(1):143-149.
151. Small GW, Shi YY, Higgins LS, Orlowski RZ. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is a mediator of breast cancer chemoresistance. *Cancer Res.* 2007; 67(9):4459-4466.
152. Wu GS. Role of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2007; 26(3-4):579-585.
153. Rojo F, Gonzalez-Navarrete I, Bragado R, Dalmases A, Menendez S, Cortes-Sempere M, Suarez C, Oliva C, Servitja S, Rodriguez-Fanjul V, Sanchez-Perez I, Campas C, Corominas JM, Tusquets I, Bellosillo B, Serrano S, et al. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human breast cancer independently predicts prognosis and is repressed by doxorubicin. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(10):3530-3539.
154. Nunes-Xavier C, Roma-Mateo C, Rios P, Tarrega C, Cejudo-Marin R, Tabernero L, Pulido R. Dual-specificity MAP kinase phosphatases as targets of cancer treatment. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011; 11(1):109-132.
155. Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J.* 2001; 353(Pt 3):417-439.

-
156. Orgad S, Brewis ND, Alphey L, Axton JM, Dudai Y and Cohen PT. The structure of protein phosphatase 2A is as highly conserved as that of protein phosphatase 1. *FEBS Lett.* 1990; 275(1-2):44-48.
 157. Mumby MC, Walter G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev.* 1993; 73(4):673-699.
 158. Mumby M. PP2A: unveiling a reluctant tumor suppressor. *Cell.* 2007; 130(1):21-24.
 159. Westermarck J, Hahn WC. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med.* 2008; 14(4):152-160.
 160. Boudreau RT, Conrad DM, Hoskin DW. Apoptosis induced by protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition in T leukemia cells is negatively regulated by PP2A-associated p38 mitogen-activated protein kinase. *Cell Signal.* 2007; 19(1):139-151.
 161. Liu WH, Chen YJ, Cheng TL, Lin SR, Chang LS. Cross talk between p38MAPK and ERK is mediated through MAPK-mediated protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha and MAPK phosphatase-1 expression in human leukemia U937 cells. *Cell Signal.* 2013; 25(9):1845-1851.
 162. Perrotti D, Neviani P. Protein phosphatase 2A (PP2A), a drugable tumor suppressor in Ph1(+) leukemias. *Cancer Metastasis Rev.* 2008; 27(2):159-168.
 163. Cristobal I, Garcia-Orti L, Cirauqui C, Alonso MM, Calasanz MJ, Odero MD. PP2A impaired activity is a common event in acute myeloid leukemia and its activation by forskolin has a potent anti-leukemic effect. *Leukemia.* 2011; 25(4):606-614.
 164. Chen J, Martin BL, Brautigan DL. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. *Science.* 1992; 257(5074):1261-1264.
 165. Calin GA, di Iasio MG, Caprini E, Vorechovsky I, Natali PG, Sozzi G, Croce CM, Barbanti-Brodano G, Russo G, Negrini M. Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) , beta (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms. *Oncogene.* 2000; 19(9):1191-1195.
 166. Esplin ED, Ramos P, Martinez B, Tomlinson GE, Mumby MC, Evans GA. The glycine 90 to aspartate alteration in the Abeta subunit of PP2A (PPP2R1B) associates with breast cancer and causes a deficit in protein function. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006; 45(2):182-190.
 167. Switzer CH, Cheng RY, Vitek TM, Christensen DJ, Wink DA, Vitek MP. Targeting SET/I(2) PP2A oncoprotein functions as a multi-pathway strategy for cancer therapy. *Oncogene.* 30(22):2504-2513.
 168. Tseng LM, Liu CY, Chang KC, Chu PY, Shiau CW, Chen KF. CIP2A is a target of bortezomib in human triple negative breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2012; 14(2):R68.
-

169. Choi YA, Park JS, Park MY, Oh KS, Lee MS, Lim JS, Kim KI, Kim KY, Kwon J, Yoon do Y, Moon EY, Yang Y. Increase in CIP2A expression is associated with doxorubicin resistance. *FEBS Lett.* 2011; 585(5):755-760.
170. Laine A, Sihto H, Come C, Rosenfeldt MT, Zwolinska A, Niemela M, Khanna A, Chan EK, Kahari VM, Kellokumpu-Lehtinen PL, Sansom OJ, Evan GI, Junttila MR, Ryan KM, Marine JC, Joensuu H, et al. Senescence sensitivity of breast cancer cells is defined by positive feedback loop between CIP2A and E2F1. *Cancer Discov.* 2013; 3(2):182-197.
171. Trunova GV, Makarova OV, Diatropov ME, Bogdanova IM, Mikchailova LP, Abdulaeva SO. Morphofunctional characteristic of the immune system in BALB/c and C57BL/6 mice. *Bull Exp Biol Med.* 2011; 151(1):99-102.
172. Maire V, Nemati F, Richardson M, Vincent-Salomon A, Tesson B, Rigai G, Gravier E, Marty-Prouvost B, De Koning L, Lang G, Gentien D, Dumont A, Barillot E, Marangoni E, Decaudin D, Roman-Roman S, et al. Polo-like kinase 1: a potential therapeutic option in combination with conventional chemotherapy for the management of patients with triple-negative breast cancer. *Cancer Res.* 2013; 73(2):813-823.
173. Azuma H, Takahara S, Ichimaru N, Wang JD, Itoh Y, Otsuki Y, Morimoto J, Fukui R, Hoshiga M, Ishihara T, Nonomura N, Suzuki S, Okuyama A, Katsuoka Y. Marked prevention of tumor growth and metastasis by a novel immunosuppressive agent, FTY720, in mouse breast cancer models. *Cancer Res.* 2002; 62(5):1410-1419.
174. Hayward JL, Carbone PP, Heuson JC, Kumaoka S, Segaloff A, Rubens RD. Assessment of response to therapy in advanced breast cancer: a project of the Programme on Clinical Oncology of the International Union Against Cancer, Geneva, Switzerland. *Cancer.* 1977; 39(3):1289-1294.
175. Cortazar P, Geyer CE Jr. Pathological complete response in neoadjuvant treatment of breast cancer. *Ann Surg Oncol.* 2015; 22(5):1441-6.
176. Di Nicolantonio F, Knight LA, Whitehouse PA, Mercer SJ, Sharma S, Charlton PA, Norris D, Cree IA. The ex vivo characterization of XR5944 (MLN944) against a panel of human clinical tumor samples. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3(12):1631-1637.
177. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991; 19(5):403-410.
178. Lozano D, Fernandez-de-Castro L, Portal-Nunez S, Lopez-Herradon A, Dapia S, Gomez-Barrena E, Esbrit P. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low-turnover osteopaenia. *Br J Pharmacol.* 2011; 162(6):1424-1438.

-
179. Cory AH, Owen TC, Barltrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun.* 1991; 3(7):207-212.
 180. Karvinen J, Hurskainen P, Gopalakrishnan S, Burns D, Warrior U, Hemmila I. Homogeneous time-resolved fluorescence quenching assay (LANCE) for caspase-3. *J Biomol Screen.* 2002; 7(3):223-231.
 181. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995; 184(1):39-51.
 182. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 1993; 15(3):532-534, 536-537.
 183. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4):402-408.
 184. Walker JM. The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol.* 1994; 32:5-8.
 185. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, et al. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28(16):2784-2795.
 186. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 2013; 31(31):3997-4013.
 187. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, McShane L, Paik S, Penault-Llorca F, Prudkin L, Regan M, Salter J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* 2011; 103(22):1656-1664.
 188. Generali D, Buffa FM, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, Bersiga A, Allevi G, Milani M, Aguggini S, Papotti M, Dogliotti L, Bottini A, Harris AL, Fox SB. Phosphorylated ERalpha, HIF-1alpha, and MAPK signaling as predictors of primary endocrine treatment response and resistance in patients with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27(2):227-234.
 189. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J Clin Oncol.* 2005; 23(36):9067-9072.
-

190. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, Symmans WF, Gonzalez-Angulo AM, Hennessey B, Green M, Cristofanilli M, Hortobagyi GN, Puzstai L. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26(8):1275-1281.
191. Gianni L, Pienkowski T, Im YH, Roman L, Tseng LM, Liu MC, Lluch A, Staroslawska E, de la Haba-Rodriguez J, Im SA, Pedrini JL, Poirier B, Mor, i P, Semiglazov V, Srimuninnimit V, Bianchi G, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2012; 13(1):25-32.
192. Bavaria MN, Jin S, Ray RM, Johnson LR. The mechanism by which MEK/ERK regulates JNK and p38 activity in polyamine depleted IEC-6 cells during apoptosis. *Apoptosis*. 19(3):467-479.
193. Perrotti D, Neviani P. Protein phosphatase 2A: a target for anticancer therapy. *Lancet Oncol*. 2013; 14(6):e229-238.
194. Saydam G, Aydin HH, Sahin F, Selvi N, Oktem G, Terzioglu E, Buyukkececi F , Omay SB. Involvement of protein phosphatase 2A in interferon-alpha-2b-induced apoptosis in K562 human chronic myelogenous leukaemia cells. *Leuk Res*. 2003; 27(8):709-717.
195. Vandevyver S, Dejager L, Van Bogaert T, Kleyman A, Liu Y, Tuckermann J , Libert C. Glucocorticoid receptor dimerization induces MKP1 to protect against TNF-induced inflammation. *J Clin Invest*. 2012; 122(6):2130-2140.
196. Staples CJ, Owens DM, Maier JV, Cato AC, Keyse SM. Cross-talk between the p38alpha and JNK MAPK pathways mediated by MAP kinase phosphatase-1 determines cellular sensitivity to UV radiation. *J Biol Chem*. 2010; 285(34):25928-25940.
197. Liu R, Zheng HQ, Zhou Z, Dong JT, Chen C. KLF5 promotes breast cell survival partially through fibroblast growth factor-binding protein 1-pERK-mediated dual specificity MKP-1 protein phosphorylation and stabilization. *J Biol Chem*. 2009; 284(25):16791-16798.
198. Small GW, Shi YY, Edmund NA, Somasundaram S, Moore DT, Orlowski RZ. Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role. *Mol Pharmacol*. 2004; 66(6):1478-1490.
199. Candas D, Lu CL, Fan M, Chuang FY, Sweeney C, Borowsky AD, Li JJ. Mitochondrial MKP1 is a target for therapy-resistant HER2-positive breast cancer cells. *Cancer Res*. 2014; 74(24):7498-7509.
200. Shi YY, Small GW, Orlowski RZ. Proteasome inhibitors induce a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent anti-apoptotic program involving MAPK phosphatase-1 and Akt in models of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2006; 100(1):33-47.

201. Gonzalez-Santiago L, Suarez Y, Zarich N, Munoz-Alonso MJ, Cuadrado A, Martinez T, Goya L, Iradi A, Saez-Tormo G, Maier JV, Moorthy A, Cato AC, Rojas JM, Munoz A. Aplidin induces JNK-dependent apoptosis in human breast cancer cells via alteration of glutathione homeostasis, Rac1 GTPase activation, and MKP-1 phosphatase downregulation. *Cell Death Differ.* 2006; 13(11):1968-1981.
202. Moncho-Amor V, Ibanez de Caceres I, B, res E, Martinez-Poveda B, Orgaz JL, Sanchez-Perez I, Zazo S, Rovira A, Albanell J, Jimenez B, Rojo F, Belda-Iniesta C, Garcia-Foncillas J, Perona R. DUSP1/MKP1 promotes angiogenesis, invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Oncogene.* 2011; 30(6):668-678.
203. Mizuno R, Oya M, Shiomi T, Marumo K, Okada Y, Murai M. Inhibition of MKP-1 expression potentiates JNK related apoptosis in renal cancer cells. *J Urol.* 2004; 172(2):723-727.
204. Wang Q, Shi S, He W, Padilla MT, Zhang L, Wang X, Zhang B, Lin Y. Retaining MKP1 expression and attenuating JNK-mediated apoptosis by RIP1 for cisplatin resistance through miR-940 inhibition. *Oncotarget.* 2014; 5(5):1304-1314.
205. Brumby AM, Goulding KR, Schlosser T, Loi S, Galea R, Khoo P, Bolden JE, Aigaki T, Humbert PO, Richardson HE. Identification of novel Ras-cooperating oncogenes in *Drosophila melanogaster*: a RhoGEF/Rho-family/JNK pathway is a central driver of tumorigenesis. *Genetics.* 2011; 188(1):105-125.
206. Foldynova-Trantirkova S, Sekyrova P, Tmejova K, Brumovska E, Bernatik O, Blankenfeldt W, Krejci P, Kozubik A, Dolezal T, Trantirek L, Bryja V. Breast cancer-specific mutations in CK1epsilon inhibit Wnt/beta-catenin , activate the Wnt/Rac1/JNK and NFAT pathways to decrease cell adhesion and promote cell migration. *Breast Cancer Res.* 2010; 12(3):R30.
207. Kim JY, Lim SC, Kim G, Yun HJ, Ahn SG, Choi HS. Interleukin-33/ST2 axis promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via upregulation of COT activity. *Oncogene.* 2014.
208. Cantrell MA, Ebelt ND, Pfefferle AD, Perou CM, Van Den Berg CL. c-Jun N-terminal kinase 2 prevents luminal cell commitment in normal mammary glands and tumors by inhibiting p53/Notch1 and breast cancer gene 1 expression. *Oncotarget.* 2015; 6(14):11863-11881.
209. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(8):537-549.
210. Zasadil LM, Andersen KA, Yeum D, Rocque GB, Wilke LG, Tevaarwerk AJ, Raines RT, Burkard ME, Weaver BA. Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. *Sci Transl Med.* 2014; 6(229):229ra243.

211. Balko JM, Cook RS, Vaught DB, Kuba MG, Miller TW, Bhola NE, Sers ME, Granja-Ingram NM, Smith JJ, Meszoely IM, Salter J, Dowsett M, Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Mills GB, Pinto JA, et al. Profiling of residual breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies DUSP4 deficiency as a mechanism of drug resistance. *Nat Med*. 2012; 18(7):1052-1059.
212. Balko JM, Schwarz LJ, Bhola NE, Kurupi R, Owens P, Miller TW, Gomez H, Cook RS, Arteaga CL. Activation of MAPK pathways due to DUSP4 loss promotes cancer stem cell-like phenotypes in basal-like breast cancer. *Cancer Res*. 2013; 73(20):6346-6358.
213. Haagenson KK, Zhang JW, Xu Z, Shekhar MP, Wu GS. Functional analysis of MKP-1 and MKP-2 in breast cancer tamoxifen sensitivity. *Oncotarget*. 2014; 5(4):1101-1110.
214. Jing J, Greshock J, Holbrook JD, Gilmartin A, Zhang X, McNeil E, Conway T, Moy C, Laquerre S, Bachman K, Wooster R, Degenhardt Y. Comprehensive predictive biomarker analysis for MEK inhibitor GSK1120212. *Mol Cancer Ther*. 2012; 11(3):720-729.
215. Manzano RG, Martinez-Navarro EM, Forteza J, Brugarolas A. Microarray phosphatome profiling of breast cancer patients unveils a complex phosphatase regulatory role of the MAPK and PI3K pathways in estrogen receptor-negative breast cancers. *Int J Oncol*. 2014; 45(6):2250-2266.
216. Skor MN, Wonder EL, Kocherginsky M, Goyal A, Hall BA, Cai Y, Conzen SD. Glucocorticoid receptor antagonism as a novel therapy for triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2013; 19(22):6163-6172.
217. Bjarnadottir O, Kimbung S, Johansson I, Veerla S, Jonsson M, Bendahl PO, Grabau D, Hedenfalk IA, Borgquist S. Global transcriptional changes following statin treatment in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2015.
218. Lin YC, Shih JY, Huang WJ, Chao SW, Chang YL, Chen CC. DUSP1 expression induced by HDAC1 inhibition mediates gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(2):428-438.
219. Liu F, Gore AJ, Wilson JL, Korc M. DUSP1 is a novel target for enhancing pancreatic cancer cell sensitivity to gemcitabine. *PLoS One*. 2014; 9(1):e84982.
220. Rincon R, Cristobal I, Zazo S, Arpi O, Menendez S, Manso R, Lluch A, Eroles P, Rovira A, Albanell J, Garcia-Foncillas J, Madoz-Gurpide J, Rojo F. PP2A inhibition determines poor outcome and doxorubicin resistance in early breast cancer and its activation shows promising therapeutic effects. *Oncotarget*. 2015; 6(6):4299-4314.
221. Suzuki K, Takahashi K. Reduced expression of the regulatory A subunit of serine/threonine protein phosphatase 2A in human breast cancer MCF-7 cells. *Int J Oncol*. 2003; 23(5):1263-1268.

-
222. Suzuki K, Takahashi K. Induction of E-cadherin endocytosis by loss of protein phosphatase 2A expression in human breast cancers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 349(1):255-260.
223. Baldacchino S, Saliba C, Petroni V, Fenech AG, Borg N, Grech G. Deregulation of the phosphatase, PP2A is a common event in breast cancer, predicting sensitivity to FTY720. *EPMA J*. 2014; 5(1):3.
224. Come C, Laine A, Chanrion M, Edgren H, Mattila E, Liu X, Jonkers J, Ivaska J, Isola J, Darbon JM, Kallioniemi O, Thezenas S, Westermarck J. CIP2A is associated with human breast cancer aggressivity. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(16):5092-5100.
225. Kalev P, Sablina AA. Protein phosphatase 2A as a potential target for anticancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011; 11(1):38-46.
226. Cristobal I, Manso R, Rincon R, Carames C, Senin C, Borrero A, Martinez-Useros J, Rodriguez M, Zazo S, Aguilera O, Madoz-Gurpide J, Rojo F, Garcia-Foncillas J. PP2A inhibition is a common event in colorectal cancer, its restoration using FTY720 shows promising therapeutic potential. *Mol Cancer Ther*. 2014; 13(4):938-947.
227. Nagaoka Y, Otsuki K, Fujita T, Uesato S. Effects of phosphorylation of immunomodulatory agent FTY720 (fingolimod) on antiproliferative activity against breast and colon cancer cells. *Biol Pharm Bull*. 2008; 31(6):1177-1181.
228. Janghorban M, Farrell AS, Allen-Petersen BL, Pelz C, Daniel CJ, Oddo J, Langer EM, Christensen DJ, Sears RC. Targeting c-MYC by antagonizing PP2A inhibitors in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111(25):9157-9162.
229. Saddoughi SA, Gencer S, Peterson YK, Ward KE, Mukhopadhyay A, Oaks J, Bielawski J, Szulc ZM, Thomas RJ, Selvam SP, Senkal CE, Garrett-Mayer E, De Palma RM, Fedarovich D, Liu A, Habib AA, et al. Sphingosine analogue drug FTY720 targets I2PP2A/SET and mediates lung tumour suppression via activation of PP2A-RIPK1-dependent necroptosis. *EMBO Mol Med*. 2013; 5(1):105-121.
230. Wong LL, Chang CF, Koay ES, Zhang D. Tyrosine phosphorylation of PP2A is regulated by HER-2 signalling and correlates with breast cancer progression. *Int J Oncol*. 2009; 34(5):1291-1301.
231. Choi YA, Koo JS, Park JS, Park MY, Jeong AL, Oh KS, Yang Y. Estradiol enhances CIP2A expression by the activation of p70 S6 kinase. *Endocr Relat Cancer*. 2014; 21(2):189-202.
232. McDermott U, Downing JR, Stratton MR. Genomics and the continuum of cancer care. *N Engl J Med*. 2011; 364(4):340-350.
-

- 233. Mitra S, Lee JS, Cantrell M, Van den Berg CL. c-Jun N-terminal kinase 2 (JNK2) enhances cell migration through epidermal growth factor substrate 8 (EPS8). *J Biol Chem*. 2011; 286(17):15287-15297.
- 234. Armes JE, Hammet F, de Silva M, Ciciulla J, Ramus SJ, Soo WK, Mahoney A, Yarovaya N, Henderson MA, Gish K, Hutchins AM, Price GR, Venter DJ. Candidate tumor-suppressor genes on chromosome arm 8p in early-onset and high-grade breast cancers. *Oncogene*. 2004; 23(33):5697-5702.
- 235. Baglia ML, Cai Q, Zheng Y, Wu J, Su Y, Ye F, Bao PP, Cai H, Zhao Z, Balko J, Zheng W, Lu W, Shu XO. Dual specificity phosphatase 4 gene expression in association with triple-negative breast cancer outcome. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; 148(1):211-220.
- 236. Cui Y, Parra I, Zhang M, Hilsenbeck SG, Tsimelzon A, Furukawa T, Horii A, Zhang ZY, Nicholson RI, Fuqua SA. Elevated expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase 3 in breast tumors: a mechanism of tamoxifen resistance. *Cancer Res*. 2006; 66(11):5950-5959.
- 237. Lu X, Yan CH, Yuan M, Wei Y, Hu G, Kang Y. In vivo dynamics and distinct functions of hypoxia in primary tumor growth and organotropic metastasis of breast cancer. *Cancer Res*. 2010; 70(10):3905-3914.
- 238. Rios P, Nunes-Xavier CE, Tabernero L, Kohn M, Pulido R. Dual-specificity phosphatases as molecular targets for inhibition in human disease. *Antioxid Redox Signal*. 2014; 20(14):2251-2273.
- 239. Cristobal I, Rincon R, Manso R, Carames C, Zazo S, Madoz-Gurpide J, Rojo F, Garcia-Foncillas J. Deregulation of the PP2A inhibitor SET shows promising therapeutic implications and determines poor clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(2):347-356.
- 240. Liu H, Gu Y, Wang H, Yin J, Zheng G, Zhang Z, Lu M, Wang C, He Z. Overexpression of PP2A inhibitor SET oncoprotein is associated with tumor progression and poor prognosis in human non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2015.
- 241. Hamdi M, Kool J, Cornelissen-Steijger P, Carlotti F, Popeijus HE, van der Burgt C, Janssen JM, Yasui A, Hoeben RC, Terleth C, Mullenders LH, van Dam H. DNA damage in transcribed genes induces apoptosis via the JNK pathway and the JNK-phosphatase MKP-1. *Oncogene*. 2005; 24(48):7135-7144.
- 242. Ohno S, Naito Y, Mukai S, Yabuta N, Nojima H. ELAS1-mediated inhibition of the cyclin G1-B'gamma interaction promotes cancer cell apoptosis via stabilization and activation of p53. *Oncogene*. 2015 Apr 27.

- 243. Junttila MR, Li SP, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J*. 2008; 22(4):954-965.
- 244. Sun T, Aceto N, Meerbrey KL, Kessler JD, Zhou C, Migliaccio I, Nguyen DX, Pavlova NN, Botero M, Huang J, Bernardi RJ, Schmitt E, Hu G, Li MZ, Dephoure N, Gygi SP, et al. Activation of multiple proto-oncogenic tyrosine kinases in breast cancer via loss of the PTPN12 phosphatase. *Cell*. 2011; 144(5):703-718.
- 245. Lopez-Knowles E, O'Toole SA, McNeil CM, Millar EK, Qiu MR, Crea P, Daly RJ, Musgrove EA, Sutherl, RL. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. *Int J Cancer*. 2010; 126(5):1121-1131.
- 246. Susila A, Chan H, Loh AX, Phang HQ, Wong ET, Tergaonkar V, Koh CG. The POPX2 phosphatase regulates cancer cell motility and invasiveness. *Cell Cycle*. 2010; 9(1):179-187.

ANEXOS

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral están plasmados en un artículo publicado y un artículo en preparación.

Artículo publicado (adjunto):

PP2A inhibition determines poor outcome and doxorubicin resistance in early breast cancer and its activation shows promising therapeutic effects. Rincón R, Cristóbal I, Zazo S, Arpí O, Menéndez S, Manso R, Lluch A, Eroles P, Rovira A, Albanell J, García-Foncillas J, Madoz-Gúrpide J, Rojo F. *Oncotarget*. 2015 Feb 28;6(6):4299-4314.

Artículo en preparación (adjunto):

Jun N-terminal kinase inactivation by MKP-1 determines resistance to taxanes and anthracyclines in breast cancer.

Además, se han publicado los siguientes artículos en los que el doctorando ha participado:

Nuclear DICKKOPF-1 as a biomarker of chemoresistance and poor clinical outcome in colorectal cancer. Aguilera Ó, González-Sancho JM, Zazo S, Rincón R, Fernández AF, Tapia O, Canals F, Morte B, Calvanese V, Orgaz JL, Niell N, Aguilar S, Freije JM, Graña O, Pisano DG, Borrero A, Martínez-Useros J, Jiménez B, Fraga MF, García-Foncillas J, López-Otín C, Lafarga M, Rojo F, Muñoz A. *Oncotarget*. 2015 Mar 20;6(8):5903-17.

Deregulation of the PP2A inhibitor SET shows promising therapeutic implications and determines poor clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer. Cristóbal I, Rincón R, Manso R, Caramés C, Zazo S, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. *Clin Cancer Res*. 2015 Jan 15;21(2):347-56.

Re: Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/ β -catenin signaling. Cristóbal I, Rincón R, Manso R, Rojo F, García-Foncillas J. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Aug 18;106(8).

Phosphorylated protein phosphatase 2A determines poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer. Cristóbal I, Manso R, Rincón R, Caramés C, Zazo S, Del Pulgar TG, Cebrián A, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. Br J Cancer. 2014 Aug 12;111(4):756-62.

Hyperphosphorylation of PP2A in colorectal cancer and the potential therapeutic value showed by its forskolin-induced dephosphorylation and activation. Cristóbal I, Rincón R, Manso R, Madoz-Gúrpide J, Caramés C, del Puerto-Nevado L, Rojo F, García-Foncillas J. Biochim Biophys Acta. 2014 Sep;1842(9):1823-9.

Deregulation of miR-200b, miR-200c and miR-429 indicates its potential relevant role in patients with colorectal cancer liver metastasis. Cristóbal I, Rincón R, Manso R, Caramés C, Aguilera O, Madoz-Gurpide J, Rojo F, García-Foncillas J. J Surg Oncol. 2014 Sep;110(4):484-5.

Potential involvement of protein phosphatase 2A in temsirolimus-mediated resensitization to cetuximab in colon cancer cells. Cristóbal I, Manso R, Rincón R, Madoz-Gúrpide J, Caramés C, Rojo F, García-Foncillas J. J Cancer Res Clin Oncol. 2014 Jul;140(7):1249-50.

Active angiogenesis in metastatic renal cell carcinoma predicts clinical benefit to sunitinib-based therapy. del Puerto-Nevado L, Rojo F, Zazo S, Caramés C, Rubio G, Vega R, Chamizo C, Casado V, Martínez-Useros J, Rincón R, Rodríguez-Remírez M, Borrero-Palacios A, Cristóbal I, Madoz-Gúrpide J, Aguilera O, García-Foncillas J. Br J Cancer. 2014 May 27;110(11):2700-7.

Up-regulation of c-Cbl suggests its potential role as oncogene in primary colorectal cancer. Cristóbal I, Manso R, Rincón R, Caramés C, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. Int J Colorectal Dis. 2014 May;29(5):641.

PP2A inhibition is a common event in colorectal cancer and its restoration using FTY720 shows promising therapeutic potential. Cristóbal I, Manso R, Rincón R, Caramés C, Senin C, Borrero A, Martínez-Useros J, Rodriguez M, Zazo S, Aguilera O, Madoz-Gúrpide J, Rojo F, García-Foncillas J. Mol Cancer Ther. 2014 Apr;13(4):938-47.

Deficiency in p53 is required for doxorubicin induced transcriptional activation of NF-κB target genes in human breast cancer. Dalmases A, González I, Menendez S, Arpi O, Corominas JM, Servitja S, Tusquets I, Chamizo C, Rincón R, Espinosa L, Bigas A, Eroles P, Furriol J, Lluch A, Rovira A, Albanell J, Rojo F. Oncotarget. 2014 Jan 15;5(1):196-210.

Además, el doctorando ha participado en congresos con los siguientes trabajos:

Differences in KRAS and BRAF mutation prevalence in metastatic colorectal carcinoma using high sensitivity TaqMelt vs ARMS Scorpion PCR assays. Zazo S, Caldes T, Pérez González N, Rincón R, Madoz-Gúrpide J, Satre J, Manso R, Ferrandez D, Ramos T, García-Foncillas J, Díaz-Rubio E. 37th ESMO (Viena, Austria). Octubre de 2012.

VEGF-VEGFR pathway and its activation in renal cell carcinoma: Role in sunitinib response. Rubio G, Casado V, León A, Dómine M, Zazo S, Lobo F, Izarzugaza Y, Arranz JL, Martín-Valadés JI, Serrano G, Caramés C, Madoz-Gúrpide J, Rincón R, Cañadas C, Pérez-González N, Fernández-Acenero MJ, Córdova S, Campos A, Rojo F, García-Foncillas J. 2012 ASCO Annual Meeting (Chicago, USA). Junio de 2012.

Las alteraciones moleculares detectadas en lesiones melánicas spitzoides mediante FISH facilitan el diagnóstico histopatológico. Rincón R, Pérez N, Zazo S, Requena JL, Madoz-Gúrpide J, Cañadas C, Chamizo C, Manzarbeitia F, Rojo F. XXV Congreso SEAP-IAP (Zaragoza, España). Mayo de 2011.

PP2A inhibition determines poor outcome and doxorubicin resistance in early breast cancer and its activation shows promising therapeutic effects

Raúl Rincón^{1,*}, Ion Cristóbal^{1,*}, Sandra Zazo², Oriol Arpi⁴, Silvia Menéndez⁴, Rebeca Manso², Ana Lluch³, Pilar Eroles³, Ana Rovira⁴, Joan Albanell⁴, Jesús García-Foncillas¹, Juan Madoz-Gúrpide², Federico Rojo^{2,4}

¹Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, Health Research Institute FJD-UAM, University Hospital "Fundación Jiménez Díaz", Madrid, Spain

²Pathology Department, IIS "Fundación Jiménez Díaz", E-28040 Madrid, Spain

³Institute of Health Research INCLIVA, Valencia, Spain

⁴Medical Oncology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain

* These authors have contributed equally to this work

Correspondence to:

Federico Rojo, e-mail: frojo@fjd.es

Keywords: PP2A inhibition, FTY720, prognosis, therapy

Received: August 11, 2014

Accepted: December 31, 2014

Published: January 30, 2015

ABSTRACT

The protein phosphatase 2A (PP2A) is a key tumor suppressor which has emerged as a novel molecular target in some human cancers. Here, we show that PP2A inhibition is a common event in breast cancer and identified PP2A phosphorylation and deregulation SET and CIP2A as molecular contributing mechanisms to inactivate PP2A. Interestingly, restoration of PP2A activity after FTY720 treatment reduced cell growth, induced apoptosis and decreased AKT and ERK activation. Moreover, FTY720 led to PP2A activation then enhancing doxorubicin-induced antitumor effects both *in vitro* and *in vivo*. PP2A inhibition (CPscore: PP2A phosphorylation and/or CIP2A overexpression) was detected in 27% of cases (62/230), and associated with grade ($p = 0.017$), relapse ($p < 0.001$), negative estrogen ($p < 0.001$) and progesterone receptor expression ($p < 0.001$), HER2-positive tumors ($p = 0.049$), Ki-67 expression ($p < 0.001$), and higher AKT ($p < 0.001$) and ERK ($p < 0.001$) phosphorylation. Moreover, PP2A inhibition determined shorter overall ($p = 0.006$) and event-free survival ($p = 0.003$), and multivariate analysis confirmed its independent prognostic impact. Altogether, our results indicate that PP2A is frequently inactivated in breast cancer and determines worse outcome, and its restoration using PP2A activators represents an alternative therapeutic strategy in this disease.

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common diagnosed cancer and accounts for the majority of cancer-related deaths in women worldwide [1]. This is a very heterogeneous disease at both molecular and clinical levels and the conventional histopathological TNM staging criteria is still used to predict prognosis [2, 3]. Actually, breast cancer classification discriminates five different tumor subtypes and a normal breast-like group based on an immunohistochemical criteria that includes expression of estrogen (ER) and progesterone

receptors (PR), and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Of importance, within this classification, the triple-negative subtype includes those cases with worst prognosis and represents a major challenge from a therapeutic perspective [4]. Therefore, it remains necessary to improve our knowledge about the molecular bases that governs breast cancer pathogenesis to develop more personalized and effective therapies that enhance patient outcomes and overcome resistance to standard chemotherapy treatments [5, 6].

The protein phosphatase 2A (PP2A) is a key tumor suppressor that regulates signaling pathways with a

Jun N-terminal kinase inactivation by MKP-1 determines resistance to taxanes and anthracyclines in breast cancer

Raúl Rincón¹, Sandra Zazo¹, Cristina Chamizo¹, Rebeca Manso¹, Paula González¹, Ion Cristóbal², Carmen Cañadas¹, Ana Lluch³, Pilar Eroles³, Ana Rovira⁴, Joan Albanell⁴, Jesús García-Foncillas², Juan Madoz-Gúrpide¹, Federico Rojo^{1,*}.

¹Pathology Department, IIS “Fundación Jiménez Díaz”, E-28040 Madrid, Spain.

²Translational Oncology Division, Oncohealth Institute, Health Research Institute FJD-UAM, University Hospital “Fundacion Jimenez Diaz”, Madrid, Spain. ³Institute of Health Research INCLIVA, Valencia, Spain. ⁴Medical Oncology Department, Hospital del Mar, Barcelona, Spain.

*Correspondence to: Dr. Federico Rojo, M.D. Ph.D, Pathology Department, University Hospital “Fundacion Jimenez Diaz”, Avda. Reyes Católicos-2 28040-Madrid, Spain. E-mail: frojo@fjd.es, Phone: +34-915504800.

Keywords: MKP-1 overexpression, JNK inhibition, prognosis, chemotherapy.

Abstract

The MAP kinase-dual specificity phosphatase 1 (MKP-1) is an oncoprotein connected with breast cancer tumorigenesis and progression. Here, we show that MKP-1 overexpression benefits breast cancer facing chemotherapy. Interestingly, docetaxel and doxorubicin treatments regulate ERK 1/2 and JNK 1/2 activation in part through MKP-1 modulation in breast cancer cells. Besides, MKP-1 induced overexpression in breast cancer cells dephosphorylates and inhibits JNK 1/2, with the consequences of higher cell growth and lower apoptotic status after these treatments. For clinical validation, we determined MKP-1 expression and JNK 1/2 phosphorylation in a large cohort of 350 early breast cancer patients treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy, observing that MKP-1 overexpression is a recurrent event mainly joined to dephosphorylated JNK 1/2, with an adverse impact in the relapse of the tumor, overall survival and disease-free survival. Of importance, MKP-1 and p-JNK 1/2 quantification in 64 locally advanced breast cancer patients from neoadjuvant taxane-based chemotherapy showed an inverse correlation between MKP-1 overexpression/JNK 1/2 inhibition and the pathological complete response of the tumors. Of importance, our results highlight the key molecular biomarker MKP-1 could be predicting a subset of breast cancer patients with worse outcome and less susceptible to be treated with clinical success

Introduction

Improving breast cancer therapeutic scene requires novel prognostic and predictive markers [1, 2]. The prognostic prediction of this heterogeneous disease is still based on the conventional histopathological TNM staging [3, 4]. While estrogen (ER) and progesterone receptors (PR) dependent tumors, as well as human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positive subtypes, have been approved for non cytotoxic regimens, triple-negative breast cancer lack of any alternative treatment further chemotherapy [5]. Hence, the molecular outlook that rules breast cancer pathogenesis has to be elucidated to set up alternative and precise therapies to enhance outcomes and overcome resistance to standard chemotherapy regimens [6, 7].

Among the proteins altered in breast cancer progression and against its treatment, mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and their phosphatases (MKPs) have been described [8, 9]. Part of the cancer-related protein kinases MAPK regulation consists in a dual dephosphorylation performed by MKPs [8]. The MAP kinase-dual specificity phosphatase 1 (MKP-1) is able to dephosphorylate all MAPKs, including Jun N-terminal kinase (JNK). In breast cancer, JNK dephosphorylation was correlated with cancer progression and tumoral survival against different stress, such as chemotherapy or oxidative damage [10-13]. Besides, MAPK-induction by paclitaxel in human breast cancer cells was inhibited by MKP-1-induction as consequence of the activation of the glucocorticoid receptor [14]. Of importance, doxorubicin is able to activate JNK pathway to achieve its anti-tumoral effect [15, 16].

Further experimental breast cancer treatments related MKP-1 with cell tumoral response to stress. In breast cancer cells, proteasome inhibitors induced anti-apoptotic pathways through MKP-1 activity [17]. Moreover, MKP-1 expression was crucial as a mediator

of progesterone receptor anti-proliferative activity in breast cancer cells [18]. Of relevance, MKP-1 inhibition by small molecules enhanced the antitumoral effect of paclitaxel [19] and transient expression modulation of this protein phosphatase defined breast cancer cells ability to survive after different cytotoxic agents [13].

Previously, we showed that MKP-1 was overexpressed during the malignant transformation of the breast, and that activation was inhibited by doxorubicin in breast cancer cells and in many human breast tumors, affecting MAPK expression [16]. Nevertheless, we discovered that breast tumors overexpressing MKP-1 did not show this MAPKs alteration after this treatment [16].

In this study, we show that MKP-1 overexpression benefits breast cancer facing chemotherapy. Of importance, we demonstrate that docetaxel and doxorubicin, two different drugs commonly include into breast cancer treatment regimens, regulates ERK1/2 and JNK1/2 activation in part through MKP-1 modulation. Further, MKP-1 overexpression in BCCL dephosphorylates JNK1/2 and delivers in higher cell growth and lower apoptotic cells after these treatments. Clinically, we quantified MKP-1 expression and JNK1/2 phosphorylation in a large cohort of 350 early breast cancer patients treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy, observing that MKP-1 overexpression is a recurrent event mainly joined to dephosphorylated JNK1/2, with an adverse impact in relapse of the tumor, overall and disease-free survival. Moreover, MKP-1 and p-JNK1/2 determination in 64 locally advanced breast cancer patients from neoadjuvant taxane-based chemotherapy showed an inverse correlation between MKP-1 overexpression/JNK1/2 inhibition and the pathological response of the tumors. Of importance, our results emphasize the key molecular biomarker MKP-1 could be predicting a subset of breast cancer patients with worse outcome and less susceptible to be treated with clinical success.

Methods

Cell cultures and reagents

MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) were cultured in DMEM/F12 (Sigma Aldrich) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Life technologies); BT-474 (ATCC HTB-20) in DMEM/F12 with 10% FBS and insulin (0.01 μ g/ml). Cell lines were grown as monolayers at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Media were supplemented with L-glutamine (2 mM) (Gibco), penicillin G (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml) (Gibco). Cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) and authenticated (LGC Standards). Reagents: doxorubicin (10 mmol/L in water), docetaxel (10 mmol/L in 13% EtOH), anisomycin (20 mg/ml in DMSO) and SP6000125 (20 mg/ml in DMSO) (Sigma Aldrich).

Patient samples

350 surgical resection specimens from primary breast tumors were obtained from Parc de Salut Mar Biobank (MARBiobanc, Barcelona, Spain), Fundación Jiménez Díaz Biobank (Madrid, Spain) and Valencia Clinic Hospital Biobank (Valencia, Spain). Tumor specimens from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks were retrospectively selected from consecutive breast cancer patients diagnosed between 1998 and 2000, which had the following criteria: infiltrating carcinomas, operable, no neoadjuvant therapy, enough available tissue and clinical follow-up. TNM (tumor–node–metastasis) staging was classified using the American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system. Histological grade was defined according Scarff–Bloom–Richardson modified by Elston criteria [20]. ER and PR were determined by immunohistochemistry (IHC) (SP1 and PgR636 clones, respectively; Dako, Carpinteria, CA) establishing positivity criteria in >1% of nuclear tumor staining [Hammond ME et

al. 2010]. HER2 amplification was assayed by FISH (Pathvysion; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) [21]. Ki-67 was studied by IHC (MIB1 clone; Dako) [22]. Clinical data were collected from medical clinical records by oncologists. Representative areas of each tumor were carefully selected and three tissue cores (1mm diameter) were obtained using a TMA workstation (T1000 Chemicon). The ethical committee and institutional review boards approved the project.

In addition, we included in the study an independent cohort of 64 patients with locally advanced breast cancer who had been treated with neoadjuvant taxane-based chemotherapy from FJD-Biobank and pre-chemotherapy diagnostic core needle biopsies were achieved. Pre-treatment tumor specimens were histologically evaluated. As a part of the established routine protocol, ER, PR, HER2 and Ki67 were evaluated by IHC and HER2 amplification was determined by FISH. High proliferation in breast cancer based on Ki67 labelling by IHC was defined following the 13th St Gallen International Breast Cancer Conference (2013) criteria based on a threshold $\geq 20\%$ of proliferation [23]. Clinical data and follow-up were obtained from review of the patients' medical records. Pre-treatment patient staging was classified using the American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system for breast cancer. Clinical tumor response to primary chemotherapy was evaluated according to the International Union Against Cancer Criteria [24]. A clinical complete response (cCR) was defined as the disappearance of all detectable malignant disease within the breast by physical examination. A reduction greater than 50% in the product of the two maximum perpendicular diameters of the tumor was classified as clinical partial response (cPR). Clinical progressive disease (cPD) was considered as an increase of at least 25%. Clinical stable disease (cSD) was defined when clinical breast cancer response did not meet the criteria for cCR, cPR or cPD. Post-chemotherapy specimens were evaluated for pathological response. A

pathological complete response (pCR) was defined as no histological evidence of invasive disease in the tumor specimen [25].

Western blot analysis

Western blot analysis in cultured cells was done following as previously reported [26]. Briefly, cells were washed in PBS and scraped and whole-cell lysates were prepared. The following antibodies were used: anti-phospho-ERK 1/2 (p-ERK 1/2; Thr202/Tyr204), anti-ERK 1/2 and anti-JNK (all from Cell Signaling Technology); Anti-ACTIVE JNK pAb (p-JNK; Thr183/Tyr185) from Promega; anti-MKP-1 from Santa Cruz Biotech; anti-GAPDH from Sigma-Aldrich; and anti-Rabbit IgG from Amersham/GE Healthcare.

Cell viability assay

Cell proliferation was measured in triplicate wells by MTS assay in 96-well plates using the CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), following the manufacturer's indications.

Colorimetric growth assay

Cell growth was measured in MDA-MB-231 and BT-474 cells overexpressing MKP-1 (and control) after different treatment regimens. Cells were cultured by triplicate and, after the cytotoxic schedule, were stained by crystal violet solution (0.2% with ethanol 2% in 0.5 M Tris-Cl buffer, pH 7.8) in 24-well plates for 5 min at room temperature. After forceful PBS washing, stained cells were uploaded with an Olympus inverted microscope. Stained cells images were quantified with Adobe Photoshop CS software as previously reported [27].

RNA extraction for gene expression studies

Total RNA from cell lines was isolated using RNeasy mini Kit (Qiagen, GMBH). RNA purity and integrity were assessed both by spectrophotometry (NanoDrop ND-2000, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) and electrophoresis (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara CA) considering for microarray experiments RNA purity, $A_{260}/A_{280} > 2.0$ and $A_{260}/A_{230} > 1.4$ and $RIN > 9.4$, as minimal requirements.

Microarray analysis

Microarray expression profiles were obtained using the Affymetrix GeneChip Human Exon 1.0 ST Array (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA). Amplification, labeling and hybridizations were performed according to protocols from Ambion (Applied Biosystems, Foster City, CA) and Affymetrix. Briefly, 200ng of total RNA were amplified using the Ambion WT Expression Kit (Applied Biosystems), labeled using the WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix), and then hybridized to Human Exon 1.0 ST Array for 16h at 45°C in a GeneChip Hybridization Oven 640. Following hybridization, array was stained in the Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 and scanned using a GeneChip Scanner 3000 7G.

Gene expression profile analysis

After quality control of raw data, it was background corrected, quantile-normalized and summarized to a gene-level using the robust multi-chip average (RMA) obtaining a total of 18708 transcript clusters. Normalized data was then filtered to avoid noise created by non-expressed transcript clusters in the condition. Only transcripts with an intensity signal of more than a 10% of all intensities of the mean of studied groups and then over 50% of variance from total resting variance were considered for further analysis, which lead to 8535 transcript clusters. Linear Models for Microarray (LIMMA), a moderated t-statistics model, was used for detecting differentially expressed genes between

conditions. Correction for multiple comparisons was performed using false discovery rate and only genes with an adjusted p-value <0.05 were selected as significant. For functional analysis purposes, genes were selected to have a non-adjusted p-value <0.05. Hierarchical cluster analysis was also performed. All data analysis was performed in R v2.11.1 with packages Aroma, Affymetrix, Biobase, Affy, LIMMA and genefilter. Functional analysis was performed with Ingenuity Pathway Analysis v9 (Ingenuity Systems, Redwood City, CA).

Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR)

Primers were designed with the DNASTar Primer design software (DNASTAR, Inc, Madison, WI) and the NCBI database. Specific primers for MKP-1 (NM_004417.3)

Fw: 5'-GAGGCCATTGACTTCATAGAC-3'; Rv: 5'-
GTAAGCAAGGCAGATGGTG-3'; ATP5E (NM_006886.3) Fw: 5'-
GTAGCTGAGTCCAGCCTGTC-3'; Rv: 5'- GATCTGGGAGTATCGGATG-3'.

Specific probes from Universal probe library (Roche Applied Science, Mannheim, GE) were selected. ATP5E was used as housekeeping gene. RNA from breast cancer cell lines was reversely transcribed to cDNA using Transcriptor Universal cDNA Master (Roche Life Science). cDNA amplification was done in a Lightcycler 480 RT PCR-System at 45 cycles. Relative gene expression was calculated according to the comparative cycle threshold (Ct) method.

Transfection and infection

Human MKP-1 cDNA was obtained from pBluescriptR vector (clone ID 4794895; Open Biosystems, Dharmacon) and digested with EcoRI and KpnI enzymes to construct a mammalian expression vector using pCMV-HA plasmid. DH5 α competent cells (Life Technologies), ampicillin and kanamycin antibiotics (Sigma-Aldrich), GeneJET

Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) and QIAGEN Plasmid Maxi Kit were required for the different protocols to goal the final construction. pCMV-HA-MKP-1 and control (pCMV-HA-CT) were transfected into MDA-MB-231 and BT-474 cells using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) in 6-well or 12-well plates. After different treatment regimens, transfected cells were used to analyze protein expression, gene expression, cell viability, cell growth and apoptosis.

Apoptosis assay

After experimental procedures, breast cancer cells were stained with annexin V and propidium iodide using Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit I (BD, NY, USA) and quantified in FACS CANTO II cytometer (BD, NY, USA).

Immunohistochemistry

Immunostainings were performed on tissue sections (3 μ m) obtained from FFPE tumors as previously described [16]. Briefly, heat antigen retrieval was performed in pH9 EDTA-based buffer (Dako) and slides were incubated with same primary antibodies against MKP-1, p-JNK or JNK [16], followed of appropriate anti-Ig horseradish peroxidase-conjugated polymer (Flex+, Dako). Sections were visualized with 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen. All stainings were performed in a Dako Autostainer. Sections incubated with normal non-immunized rabbit immunoglobulins were used as negative controls. As positive control, sections of breast tumor with known expression of targets were used. Antibody sensitivity was calculated in a range of crescent dilutions of primary antibody (MKP-1: 1:50-1:200, p-JNK: 1:10-1:200, JNK: 1:100-1:1000). Specificity was confirmed in a set of paired fresh frozen and FFPE samples were processed by western blot and IHC. Antigen preservation in tissues was confirmed assaying for expression of phospho-tyrosines using a monoclonal antibody to tyrosine-

phosphorylated proteins (clone 4G10, 1:500, Millipore). Only the membrane of epithelial cells, but not stromal cells, was evaluated for MKP-1, p-JNK and JNK expression blinded to clinical data was evaluated by two investigators (FR and SZ). A semiquantitative histoscore (Hscore) was calculated by estimation of the percentage of tumor cells positively stained with low, medium, or high staining intensity. The final score was determined after applying a weighting factor to each estimate. The formula used was $Hscore = (low\ \%) \times 1 + (medium\ \%) \times 2 + (high\ \%) \times 3$, and the results ranged from 0 to 300.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 20 for windows (SPSS Inc, Chicago Illinois). Overall survival (OS) was defined as the time from diagnosis to the date of death from any cause or last follow-up. Disease-free survival (EFS) was defined as the time from diagnosis until first event, in which relapse at any location, death or end of follow-up were considered events. Kaplan-Meier method and survival comparisons were done with the log-rank test. The Cox proportional hazards model was adjusted taking into consideration significant parameters in univariate analysis. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant. Receiver operating curve (ROC) was used to determine the optimal cutoff point based on progression end point for MKP-1, p-JNK and JNK expression as previously described [28]. This work was carried out in accordance with Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK) guidelines [29]. Analysis of experimental conditions was done by paired t-test. All the statistical tests were conducted at two sided 0.05 level of significance.

Results

Chemotherapy treatments activate MAPK through MKP-1 in breast cancer cell lines

Firstly, we analyzed the ability of the chemotherapeutic drugs docetaxel and doxorubicin to regulate MAPK activation, in MDA-MB-231 and BT-474 breast cancer cells. We assayed doxorubicin and docetaxel IC_{50} for 24 hours using the MTS assay, resulting 17.3 $\mu\text{mol/L}$ and 48.3 nmol/L , respectively (data not shown). Thus, we performed a microarray gene expression to investigate the molecular modulation exerted by docetaxel and doxorubicin in our human breast cancer cells. Upon 4 hours of doxorubicin exposure, more than 300 genes were differentially modulated in MDA-MB-231 compared with control cells (Fig. 1A). Among these genes, MKPs like MKP-1 were in the 25-top of down-expressed targets. Something similar resulted with the microarray performed upon docetaxel exposure in BT-474 (Fig. 1B). More than 1500 genes were differentially modulated in this breast cancer cells compared with control cells, including MKP-1 and others MKPs among them. Real Time-qPCR analysis were assessed to confirm this down-expression of MKP-1 in response to chemotherapy, showing that doxorubicin easily inhibited MKP-1 gene expression in both cell lines, while high docetaxel doses were required to perform this inhibition (Fig. 1C and 1D). In any case, both docetaxel and doxorubicin showed ability to inhibit MKP-1 expression in breast cancer cells.

To check this molecular effect, we afterwards treated MDA-MB-231 and BT-474 cells with docetaxel 50 nmol/L and doxorubicin 10 $\mu\text{mol/L}$ for 24 hours, to further quantify the phosphorylation status of MAPKs. As expected, western blotting analyses revealed a clearly higher phosphorylation status of JNK1/2 and ERK1/2, in both breast cancer cells (Fig. 2A and 2B). Besides, MKP-1 inhibition after doxorubicin treatment was

confirmed in both cell lines, meanwhile docetaxel did not altered its protein expression (Fig. 2A and 2B). Thus, MAPK alteration by these cytotoxic agents could implicate MKP-1 in human breast cancer cells.

MKP-1 overexpression improves cell survival against docetaxel and doxorubicin in breast cancer cell lines

To clarify the importance of MKP-1 in docetaxel and doxorubicin effects in breast cancer cells, we transfected MDA-MB-231 and BT-474 with a plasmid construction containing MKP-1 clone cDNA (material and methods). Gene expression quantification of MKP-1 by Real Time-qPCR showed higher expression of the protein phosphatase in both cell lines, despite of drug treatments between transfection and RNA extraction (Fig. 3A and 3B). Besides, western blot analysis revealed the overexpression of MKP-1 in both MDA-MB-231 and BT-474, showing higher protein detection resulted from the combination of MKP-1 and HA-tag (Fig. 3C). As previously published, endogenous MKP-1 protein expression was inhibited by doxorubicin in both cell lines, whereas the ectopic expression of the phosphatase was totally inhibited in BT-474, but not completely in MDA-MB-231 cells (Fig. 3C).

Further, we tested cell viability in both breast cancer cells overexpressing MKP-1 with different methods. After ranges of chemotherapy expositions, crystal violet images quantification (Supplemental Fig. S1) revealed a considerable defense of breast cancer cells overexpressing MKP-1 against both drugs, comparing with control cells (Fig. 4A). This cell growth ability in transfected cells were variable between MDA-MB-231 and BT-474, and the significance was not strong in every drug condition, but the summarized result displayed a higher growth capability of transfected cells in most of the cases (Fig. 4A). Besides, we next yield cell viability in breast cancer cells after 24

hours of docetaxel 50 nmol/L and doxorubicin 10 μ mol/L using MTS assay, and we obtained higher viability values in transfected cells rather than control cells, in MDA-MB-231 and BT-474 (Fig. 4B), with significance in all conditions. Finally, we quantified apoptosis in both cell lines, overexpressing MKP-1 and being treated with docetaxel and doxorubicin; to further performing an annexin V and propidium iodide detection kit. In all cases, breast cancer cells overexpressing MKP-1 reduced the relative amount of apoptotic cells after the chemotherapy treatments, with significant difference in all cases except docetaxel-treated BT-474 cells (Fig. 4C).

JNK inactivation by MKP-1 overexpression reduces apoptosis in BCCL

Considering that MDA-MB-231 and BT-474 cells transiently overexpressing MKP-1 displayed higher cell viability and lower apoptosis activation after chemotherapy exposition, we tried to elucidate molecular mechanisms implicated in this improving survival effect quantified in vitro. As JNK1/2 is valued as one of the most classically MAPK pro-apoptotic modulator, we treated MKP-1-overexpressing cells with JNK1/2 activator and inhibitor agents (anisomycin and SP6000125, respectively) before the chemotherapy regimen. JNK1/2 modulator agents were tested in both breast cancer cell lines before performing the complete experiment (data not shown).

Western blot analysis showed that MKP-1 overexpression was able to dephosphorylate JNK1/2 in both cell lines (Fig. 5). Besides, while JNK-induced activation was quite supported despite chemotherapy treatments in control cells, anisomycin was unable to enforce this effect in the presence of MKP-1-overexpressing cells (Fig. 5). In the case of JNK1/2 inhibitor, transfected cells increased the dephosphorylation of JNK1/2, as a result of MKP-1 dephosphorylation in combination with JNK1/2 modulation with SP6000125 (Fig. 5). In parallel to protein expression quantification, cell growth values

resulted in increased viability of transfected cells after docetaxel and doxorubicin treatments, despite of the JNK1/2 modulator included in every condition (Fig. 6A). This ability of MKP-1-overexpressed cells to growth was more important in anisomycin-pretreated cells, where general cell viability was markedly diminished in control cells (Fig. 6A). Cell viability relative values were significantly different in most of the conditions. Finally, apoptosis quantification showed that MKP-1 overexpression inhibited in part anisomycin induction of apoptosis; and that MKP-1 ectopic expression combined with JNK1/2 inhibition induced by SP6000125 resulted in similar apoptosis inhibition in both breast cancer cells (Fig. 6B).

Prevalence of MKP-1 and activated JNK expression in human breast cancer

In order to validate in vitro experiments of MKP-1-overexpressing cells chemoresistance obtained in MDA-MB-231 and BT-474 cell lines, we investigate the prevalence and clinical significance of MKP-1 overexpression and its connection with JNK1/2 activation status. With this purpose, we quantified MKP-1 and p-JNK1/2 expression in a cohort of 350 tumors of patients with early breast cancer treated with adjuvant anthracycline-based chemotherapy. Patient characteristics are shown in Table S1 and immunohistochemical detections of MKP-1 and p-JNK1/2 are presented in Figure 7A. MKP-1 and p-JNK1/2 was expressed mainly in the nucleus of tumor cells and diffusely distributed in the tumor. Faint levels of MKP-1 and p-JNK1/2 were detected in normal breast epithelium and stromal cells.

High MKP-1 levels were quantified in 31% of cases (109/350). Thus, we observed that high MKP-1 expression associated with the size of the tumors ($p = 0.013$) and with the patients who relapsed ($p < 0.001$). Finally, we observed that MKP-1 overexpression was not dependent on the molecular subtype of the tumors. Among tumors with high MKP-1

expression, low levels of p-JNK1/2 were found in 80% of cases (87/109). Hence, JNK1/2 inhibition was associated with the same parameters that high MKP-1 expression (size of the tumors and relapse), following both molecular determination the same tendency in these clinical and molecular comparisons.

Association between MKP-1 and p-JNK1/2 expression and molecular and clinical parameters are included in Table 1.

JNK activation and MKP-1 expression in human breast cancer determines benefit to chemotherapy

Complete clinical follow-up data were available for all the 350 patients included in the study, with a median of age of 58 years (range: 27-89). Of relevance, MKP-1 overexpression was found in those patients who relapsed ($p < 0.001$). Moreover, the subgroup of patients with MKP-1 overexpression showed a substantially shorter OS ($p < 0.001$) and DFS ($p < 0.001$), with the worst survival quantification in those patients with p-JNK1/2 inhibition (Figure 7B and 7C). Multivariate Cox analysis demonstrated that MKP-1 together with p-JNK1/2 behave as an adverse independent factor associated with OS (HR 26.1; 95% CI, 10.1-67.4; $p < 0.001$) (Table 2) and DFS (HR 33.4; 95% CI, 14.8-75.4; $p < 0.001$) (Table S2) in early breast cancer.

JNK activation and MKP-1 expression determines response to docetaxel in human breast cancer patients

In order to provide clinical evidences to prove that MKP-1 overexpression determines docetaxel resistance, we analyzed MKP-1 and p-JNK1/2 expression in an independent set of 64 patients with locally advanced breast cancer who received neoadjuvant taxane-based chemotherapy. Patient characteristics are shown in Table S3.

The mean time from the diagnostic biopsy to the beginning of chemotherapy was 21.3 days (range 1–48 days). During that period of time, patients underwent standard clinical and radiological tumor staging. Patients received a median of 4 cycles of chemotherapy (range 2–6 cycles). After recovering from the effects of chemotherapy, the patients underwent surgery. The mean time between the last dose of chemotherapy and acquisition of the post-chemotherapy specimen from surgery was 30.3 days (range 8–59 days). 18 patients (28.1%) achieved a pathological complete response in the surgery specimen according to histopathological evaluation. Interestingly, we observed that MKP-1 and p-JNK1/2 expression correlates with pathological response ($p = 0.008$) (Table 3).

Discussion

MKP-1 is proved to act as an oncoprotein in breast cancer progression and is related to antitumoral responses against several chemotherapy drugs [13, 16]. At the present work, we report that MKP-1 overexpression is a crucial event in a subset of breast tumors (31% of patients) and define JNK1/2 dephosphorylation as the main molecular event induced by MKP-1 to promote tumoral cells survival after chemotherapy treatment in these tumors (80% of MKP-1-overexpressing tumors). In vitro, we demonstrate that MKP-1 overexpression dephosphorylates JNK1/2, improve cell viability and significantly reduce apoptosis activation, after doxorubicin and docetaxel treatments. We also show that JNK1/2 activation induction is able to better assist chemotherapy proapoptotic signaling in breast cancer cells when MKP-1 is not overexpressed; and, to the contrary, the inhibition of this MAPK improve MKP-1 overexpression tumoral effects. Moreover, patients with MKP-1 overexpression have significantly worse clinical outcome and multivariate analysis demonstrate that the overexpression of this phosphatase has an independent prognostic value for overall and disease-free survival in adjuvant chemotherapy. Further, MKP-1 and p-JNK1/2 molecular analysis associated with pathological response in locally advanced breast cancer patients treated with neoadjuvant taxane-based chemotherapy. Consequently, our results prove that MKP-1 overexpression and JNK1/2 inhibition are particular molecular events with a high clinical relevance in breast cancer to keep on mind as an important predictive marker of a subset of tumors in which chemotherapy regimens would lack clinical success.

Gene and protein expression levels of MKP-1 has been extensively studied; not only in human cancer, but in other malignancies and tissues. This MAP kinase-dual specificity phosphatase is ubiquitously expressed and is able to be stimulated by growth factors, oxidative stress, chemical damage and others stimuli [30]. Its ability to dephosphorylate

p38, JNK and ERK1/2 MAPK, in this specific order of affinity [31], has been extensively proved to be dependent on the cellular stimulation to perform. Besides, MAPK pathway is able to control MKP-1 expression to favor specific molecular effects, producing complex regulatory loops among MAPKs and MKP-1 which need to be further explained [32, 33].

ERK1/2 modulation by MKP-1 to inhibit antitumoral effects in breast cancer has been described in several studies [34-36]. Besides, other works designated JNK1/2 dephosphorylation as the major molecular event after specific breast cancer treatments [13, 37, 38]. Our results show that, when MKP-1 was overexpressed, the crucial alteration performance in breast cancer cells consists in the dephosphorylation of JNK1/2. Further, we verify that previous induced JNK1/2 activation is able to retard this MKP-1 overexpression ability to prevent tumoral cell death by chemotherapy. Despite MAPK signaling is proved to be altered in breast cancer in many ways, the ability of MKP-1 to modulate these protein kinases should be joined to particular cellular responses more than to an unbroken affinity pattern of dephosphorylation. Actually, p38-MAPK alteration by MKP-1 in breast cancer is also known to be related to [17].

In our subset of early breast cancer patients, most of our MKP-1-overexpressing tumors showed low levels of p-JNK1/2. However, approximately 20% of them seemed to express high levels of this activated MAPK. Though elevated MKP-1 expression was generally linked to dephosphorylation of JNK1/2, and not only in breast cancer [39, 40]; there are other pathways demonstrated to exert JNK1/2 phosphorylation in order to produce the tumoral progress. JNK pathway activation was linked with the up-regulation of Ras in certain human tumors, including HER2-positive breast cancer [41]. Besides, casein kinase 1 epsilon-mutant breast cancer leaded to the activation of Wnt/Rac1/JNK/AP1 pathway, instead of canonical Wnt/ β -catenin, mediating higher

invasion ability and aggressiveness of breast cancer cells [42]. Further, it was showed that interleukin-33 (IL-33) provoked epithelial cell transformation and breast tumorigenesis by activation of MEK-ERK, JNK-cJun and STAT3 through IL-33/ST2/COT cascade [43]. Hence, the different isoforms of JNK can exert anti and pro-tumoral modulations in different cell types and stages of cancer, including breast tumors [44].

Our previous results marked the MKP-1 down-regulation in breast cancer cells and breast tumors, after doxorubicin treatment; with the activation of ERK1/2 and JNK1/2 as molecular consequences [16]. As well as anthracyclines, taxanes are common drugs used in current adjuvant and neoadjuvant chemotherapy to treat breast cancer; but this family of chemicals is widely proved to modulate microtubules control and signaling during mitosis more than MAPK signaling [45, 46]. At the present study, we demonstrate that breast cancer cells overexpressing MKP-1 acquire ability to better grow and to inhibit apoptosis activation, after both doxorubicin and docetaxel treatments. Clinically, we show that breast tumors overexpressing MKP-1 better survive to adjuvant anthracycline-based chemotherapy, and that the dephosphorylation of JNK1/2 in those tumors appeared as the molecular mechanism this MKP-1 overexpression is performing to overcome the cytotoxic adjuvant treatment. Finally, as we proved analyzing these proteins in an independent cohort of tumors, locally advanced breast cancer tumors with MKP-1 overexpression and JNK1/2 inhibition are resistant to neoadjuvant taxane-based chemotherapy.

This chemoresistant capacity of MKP-1 in breast cancer cells was previously published, especially by Small and collaborators [13]. In based on different experimental procedures altering MKP-1 expression, these authors proved the increased viability breast cancer cells showed with MKP-1 transient or stable overexpression, in front of

distinct agents used in chemotherapy [13]. Considering our results, we have confirmed their finding about the ability of the protein phosphatase overexpression to inhibit JNK1/2 activation, in these tumoral cells. Further, we describe the clinical significance this molecular event should have in a particular subset of breast tumors, where the overexpressed level of MKP-1 would hinder the adjuvant chemotherapy effects and would enable the relapse of the tumor.

Despite we centered our work in the discovery of new approaches about MKP-1 expression and chemotherapy response in breast cancer, some literature have tried to linked the expression of this protein phosphatase with breast cancer models treated with other type of agents. MDA-MB-231 cells treated with proteasome inhibitors showed an inactivation of ERK1/2 related with the induction of MKP-1 [37]. Besides, MDA-MB-231 xenograft models pretreated with a glucocorticoid receptor antagonist before dexamethasone/paclitaxel treatment; increased cytotoxicity and inhibited MKP-1 expression [47]. Finally, MKP-1 expression and mitochondrial localization was related with anti-HER2 therapy resistance in HER2-positive tumors [38]. In our cohort of patients, MKP-1 overexpression was not correlated with intrinsic subtype (Table 1), so the molecular and therapeutic implications of different pro-survival events performing by MKP-1 in every breast tumor subtype would establish heterogeneity as wide as breast cancer heterogeneity itself.

Minding the several molecular points to solve about MKP-1 signaling in breast cancer, the overexpression of this MAPK phosphatase is a molecular event to consider as a crucial biomarker to characterize and treat breast cancer. Our clinical results supports that almost 1 of every 4 breast cancer patients would survive worse after adjuvant chemotherapy because of molecular signaling related with MKP-1 overexpression and JNK1/2 dephosphorylation. Further, most of these tumors would suffer relapse of the

illness, which could be predicted by the protein detection of MKP-1 as part of the pathologic markers screening to diagnose breast cancer.

In conclusion, our results highlight that MKP-1 overexpression is a crucial event with high molecular and clinical relevance in breast cancer. Moreover, the high prevalence this alteration show linked to JNK1/2 dephosphorylation represents a key molecular mechanism to further be elucidated in order to understand this breast cancer pro-survival mechanism. Therefore, the incorporation of MKP-1 expression as prognostic and predictive biomarker would facilitate breast tumors management to decide the best therapeutic regimens to improve breast cancer patient survival.

References

1. DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A: Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 64(1):52-62.
2. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Thompson A, Zackrisson S, Cardoso F: Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 24 Suppl 6:vi7-23.
3. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR: Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 2005, 205(2):248-254.
4. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA et al: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406(6797):747-752.
5. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, Senn HJ: Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*, 24(9):2206-2223.
6. Longley DB, Johnston PG: Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* 2005, 205(2):275-292.
7. De Abreu FB, Schwartz GN, Wells WA, Tsongalis GJ: Personalized therapy for breast cancer. *Clin Genet*, 86(1):62-67.
8. Nunes-Xavier C, Roma-Mateo C, Rios P, Tarrega C, Cejudo-Marin R, Tabernero L, Pulido R: Dual-specificity MAP kinase phosphatases as targets of cancer treatment. *Anticancer Agents Med Chem*, 11(1):109-132.

9. Keyse SM: Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2008, 27(2):253-261.
10. Haagensohn KK, Wu GS: The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev*, 29(1):143-149.
11. Zhou JY, Liu Y, Wu GS: The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in oxidative damage-induced cell death. *Cancer Res* 2006, 66(9):4888-4894.
12. Wu GS: Role of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007, 26(3-4):579-585.
13. Small GW, Shi YY, Higgins LS, Orlowski RZ: Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is a mediator of breast cancer chemoresistance. *Cancer Res* 2007, 67(9):4459-4466.
14. Wu W, Pew T, Zou M, Pang D, Conzen SD: Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. *J Biol Chem* 2005, 280(6):4117-4124.
15. Kim J, Freeman MR: JNK/SAPK mediates doxorubicin-induced differentiation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2003, 79(3):321-328.
16. Rojo F, Gonzalez-Navarrete I, Bragado R, Dalmases A, Menendez S, Cortes-Sempere M, Suarez C, Oliva C, Servitja S, Rodriguez-Fanjul V et al: Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human breast cancer independently predicts prognosis and is repressed by doxorubicin. *Clin Cancer Res* 2009, 15(10):3530-3539.

17. Shi YY, Small GW, Orlowski RZ: Proteasome inhibitors induce a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent anti-apoptotic program involving MAPK phosphatase-1 and Akt in models of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006, 100(1):33-47.
18. Chen CC, Hardy DB, Mendelson CR: Progesterone receptor inhibits proliferation of human breast cancer cells via induction of MAPK phosphatase 1 (MKP-1/DUSP1). *J Biol Chem*, 286(50):43091-43102.
19. Vogt A, McDonald PR, Tamewitz A, Sikorski RP, Wipf P, Skoko JJ, 3rd, Lazo JS: A cell-active inhibitor of mitogen-activated protein kinase phosphatases restores paclitaxel-induced apoptosis in dexamethasone-protected cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2008, 7(2):330-340.
20. Elston CW, Ellis IO: Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991, 19(5):403-410.
21. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P et al: Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol*, 31(31):3997-4013.
22. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T et al: Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst*, 103(22):1656-1664.
23. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B, Senn HJ: Personalizing the treatment of women with early

- breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol* 2013, 24(9):2206-2223.
24. Hayward JL, Carbone PP, Heuson JC, Kumaoka S, Segaloff A, Rubens RD: Assessment of response to therapy in advanced breast cancer: a project of the Programme on Clinical Oncology of the International Union Against Cancer, Geneva, Switzerland. *Cancer* 1977, 39(3):1289-1294.
25. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, Bonnefoi H, Cameron D, Gianni L, Valagussa P et al: Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet* 2014, 384(9938):164-172.
26. Codony-Servat J, Tapia MA, Bosch M, Oliva C, Domingo-Domenech J, Mellado B, Rolfe M, Ross JS, Gascon P, Rovira A et al: Differential cellular and molecular effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006, 5(3):665-675.
27. Lozano D, Fernandez-de-Castro L, Portal-Nunez S, Lopez-Herradon A, Dapia S, Gomez-Barrena E, Esbrit P: The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low-turnover osteopaenia. *Br J Pharmacol* 2011, 162(6):1424-1438.
28. Generali D, Buffa FM, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, Bersiga A, Allevi G, Milani M, Aguggini S et al: Phosphorylated ERalpha, HIF-1alpha, and MAPK signaling as predictors of primary endocrine treatment response and resistance in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2009, 27(2):227-234.

29. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM: Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J Clin Oncol* 2005, 23(36):9067-9072.
30. Boutros T, Chevet E, Metrakos P: Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacol Rev* 2008, 60(3):261-310.
31. Farooq A, Zhou MM: Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal* 2004, 16(7):769-779.
32. Amit I, Citri A, Shay T, Lu Y, Katz M, Zhang F, Tarcic G, Siwak D, Lahad J, Jacob-Hirsch J et al: A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat Genet* 2007, 39(4):503-512.
33. Staples CJ, Owens DM, Maier JV, Cato AC, Keyse SM: Cross-talk between the p38alpha and JNK MAPK pathways mediated by MAP kinase phosphatase-1 determines cellular sensitivity to UV radiation. *J Biol Chem*, 285(34):25928-25940.
34. Orlowski RZ, Small GW, Shi YY: Evidence that inhibition of p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling is a factor in proteasome inhibitor-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2002, 277(31):27864-27871.
35. Pervin S, Singh R, Freije WA, Chaudhuri G: MKP-1-induced dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase is essential for triggering nitric oxide-induced apoptosis in human breast cancer cell lines: implications in breast cancer. *Cancer Res* 2003, 63(24):8853-8860.
36. Liu R, Zheng HQ, Zhou Z, Dong JT, Chen C: KLF5 promotes breast cell survival partially through fibroblast growth factor-binding protein 1-

- pERK-mediated dual specificity MKP-1 protein phosphorylation and stabilization. *J Biol Chem* 2009, 284(25):16791-16798.
37. Small GW, Shi YY, Edmund NA, Somasundaram S, Moore DT, Orlowski RZ: Evidence that mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 induction by proteasome inhibitors plays an antiapoptotic role. *Mol Pharmacol* 2004, 66(6):1478-1490.
38. Candas D, Lu CL, Fan M, Chuang FY, Sweeney C, Borowsky AD, Li JJ: Mitochondrial MKP1 Is a Target for Therapy-Resistant HER2-Positive Breast Cancer Cells. *Cancer Res*, 74(24):7498-7509.
39. Gonzalez-Santiago L, Suarez Y, Zarich N, Munoz-Alonso MJ, Cuadrado A, Martinez T, Goya L, Iradi A, Saez-Tormo G, Maier JV et al: Aplidin induces JNK-dependent apoptosis in human breast cancer cells via alteration of glutathione homeostasis, Rac1 GTPase activation, and MKP-1 phosphatase downregulation. *Cell Death Differ* 2006, 13(11):1968-1981.
40. Moncho-Amor V, Ibanez de Caceres I, Bandres E, Martinez-Poveda B, Orgaz JL, Sanchez-Perez I, Zazo S, Rovira A, Albanell J, Jimenez B et al: DUSP1/MKP1 promotes angiogenesis, invasion and metastasis in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 30(6):668-678.
41. Brumby AM, Goulding KR, Schlosser T, Loi S, Galea R, Khoo P, Bolden JE, Aigaki T, Humbert PO, Richardson HE: Identification of novel Ras-cooperating oncogenes in *Drosophila melanogaster*: a RhoGEF/Rho-family/JNK pathway is a central driver of tumorigenesis. *Genetics*, 188(1):105-125.
42. Foldynova-Trantirkova S, Sekyrova P, Tmejova K, Brumovska E, Bernatik O, Blankenfeldt W, Krejci P, Kozubik A, Dolezal T, Trantirek L et al: Breast

- cancer-specific mutations in CK1epsilon inhibit Wnt/beta-catenin and activate the Wnt/Rac1/JNK and NFAT pathways to decrease cell adhesion and promote cell migration. *Breast Cancer Res*, 12(3):R30.
43. Kim JY, Lim SC, Kim G, Yun HJ, Ahn SG, Choi HS: Interleukin-33/ST2 axis promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via upregulation of COT activity. *Oncogene*.
 44. Wagner EF, Nebreda AR: Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 2009, 9(8):537-549.
 45. De S, Cipriano R, Jackson MW, Stark GR: Overexpression of kinesins mediates docetaxel resistance in breast cancer cells. *Cancer Res* 2009, 69(20):8035-8042.
 46. Zasadil LM, Andersen KA, Yeum D, Rocque GB, Wilke LG, Tevaarwerk AJ, Raines RT, Burkard ME, Weaver BA: Cytotoxicity of paclitaxel in breast cancer is due to chromosome missegregation on multipolar spindles. *Sci Transl Med*, 6(229):229ra243.
 47. Skor MN, Wonder EL, Kocherginsky M, Goyal A, Hall BA, Cai Y, Conzen SD: Glucocorticoid receptor antagonism as a novel therapy for triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*, 19(22):6163-6172.

Acknowledgments

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Financial support

This work was supported by PT13/0010/0012, RD12/0036/0051, RD12/0036/0070, PI12/00680, PI12/01421, PI12/01552, SAF2011-26900 grants from Instituto de Salud Carlos III, S2010/BMD-2344 from Comunidad de Madrid, 2009 SGR 321 and 2009 SRG 524. J.A. and F.R. are recipients of intensification program ISCIII/FEDER. R.M. and P.G. are supported by Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz.

Figure Legends

Figure 1. MKP-1 is involved in the response of BCCLs to docetaxel and doxorubicin. Microarray gene expression profiles of BT-474 cells after docetaxel treatment (A) and MDA-MB-231 cells after doxorubicin treatment (B), showing down and up-regulated top 25 genes comparing treated cells with control. Gene expression analysis by Real Time-qPCR of MKP-1 in MDA-MB-231 (C) and BT-474 (D) cells after docetaxel (D, nmol/L) and doxorubicin (X, μ mol/L) for 24 hours. Green color indicates under expressed (down-regulated) genes; Red color indicates overexpressed (up-regulated) genes.

Figure 2. Docetaxel and doxorubicin regulates MAPK and MKP-1 in BCCLs. Western blot analysis showing the molecular effects induced after docetaxel (50 nmol/L) and doxorubicin (10 μ mol/L) treatment for 24 hours, in MDA-MB-231 (A) and BT-474 cells (B).

Figure 3. MKP-1 overexpression in breast cancer cells. (A) Gene expression analysis by Real Time-qPCR of MKP-1 in MDA-MB-231 (A) and BT-474 (B) cells after induced-overexpression of MKP-1 by plasmidic transfection and chemotherapy treatment. (C) Western blot analysis showing MKP-1 overexpression after plasmidic transfection and chemotherapy treatment in MDA-MB-231 and BT-474 cells. pCMV-HA-CT: transfection with empty plasmidic construction. pCMV-HA-MKP-1: transfection with the plasmidic construction including MKP-1 gene. D: docetaxel (nmol/L). X: doxorubicin (μ mol/L).

Figure 4. Chemoresistance in breast cancer cells after MKP-1 overexpression. (A) Relative cell area analysis from crystal violet colorimetric growth assay (material and methods) after MKP-1 overexpression and chemotherapy treatment, in MDA-MB-231

and BT-474 cells. (B) Relative cell viability analysis from MTS assay (material and methods) after MKP-1 overexpression and chemotherapy treatment, in MDA-MB-231 and BT-474 cells. (C) Relative fold change in apoptotic cells from annexin V and propidium iodide staining (material and methods) after MKP-1 overexpression and chemotherapy treatment, in MDA-MB-231 and BT-474 cells. pCMV-HA-CT: transfection with empty plasmidic construction. pCMV-HA-MKP-1: transfection with the plasmidic construction including MKP-1 gene. D: docetaxel (nmol/L); X: doxorubicin ($\mu\text{mol/L}$).

Figure 5. MKP-1 overexpression and JNK regulation after chemotherapy treatment in breast cancer cells. Western blot analysis of MDA-MB-231 and BT-474 cells after MKP-1 overexpression, and treatments with JNK1/2 modulators and chemotherapy. pCMV-HA-CT: transfection with empty plasmidic construction. pCMV-HA-MKP-1: transfection with the plasmidic construction including MKP-1 gene.

Figure 6. Apoptosis reduction after MKP-1 overexpression and JNK regulation in BCCL. (A) Relative cell viability analysis from MTS assay (material and methods) after MKP-1 overexpression and treatments with JNK1/2 modulators and chemotherapy. (B) Relative fold change in apoptotic cells from annexin V and propidium iodide staining (material and methods) after MKP-1 overexpression and treatments with JNK1/2 modulators and chemotherapy. pCMV-HA-CT: transfection with empty plasmidic construction. pCMV-HA-MKP-1: transfection with the plasmidic construction including MKP-1 gene.

Figure 7. JNK activation and MKP-1 expression in human breast cancer determines benefit to chemotherapy. (A) Immunohistochemical detection of MKP-1 and p-JNK1/2 showing positive and negative staining. The line shows 30 μm . Magnification x200.

Kaplan-Meier analyses of overall survival (B) and disease-free survival (C) in a cohort of 350 breast cancer patients.

Supplemental Figure 1. Chemoresistance in breast cancer cells after MKP-1 overexpression. Representative microscope images of MDA-MB-231 and BT-474 cells overexpressing MKP-1 treated with chemotherapy and stained with crystal violet. HA: transfection with empty plasmidic construction. HA M1: transfection with the plasmidic construction including MKP-1 gene. D: docetaxel (nmol/L); X: doxorubicin (μ mol/L).

Table legends

Table 1. Association of MKP-1 and p-JNK expression with molecular and clinical parameters in 350 BC patients.

Table 2. Univariate and multivariate Cox analyses in the cohort of 350 breast cancer patients (overall survival analysis).

Table 3. MKP-1 and p-JNK 1/2 in locally advanced breast cancer patients who received neoadjuvant taxane-based chemotherapy.

Supplemental Table 1. Clinical and molecular characteristics of a series of 350 patients with early breast cancer.

Supplemental Table 2. Univariate and multivariate Cox analyses in the cohort of 350 breast cancer patients (disease-free survival analysis).

Supplemental Table 3. Clinical and molecular characteristics of 64 locally advanced breast cancer patients who received neoadjuvant taxane-based chemotherapy.

Figure 1.

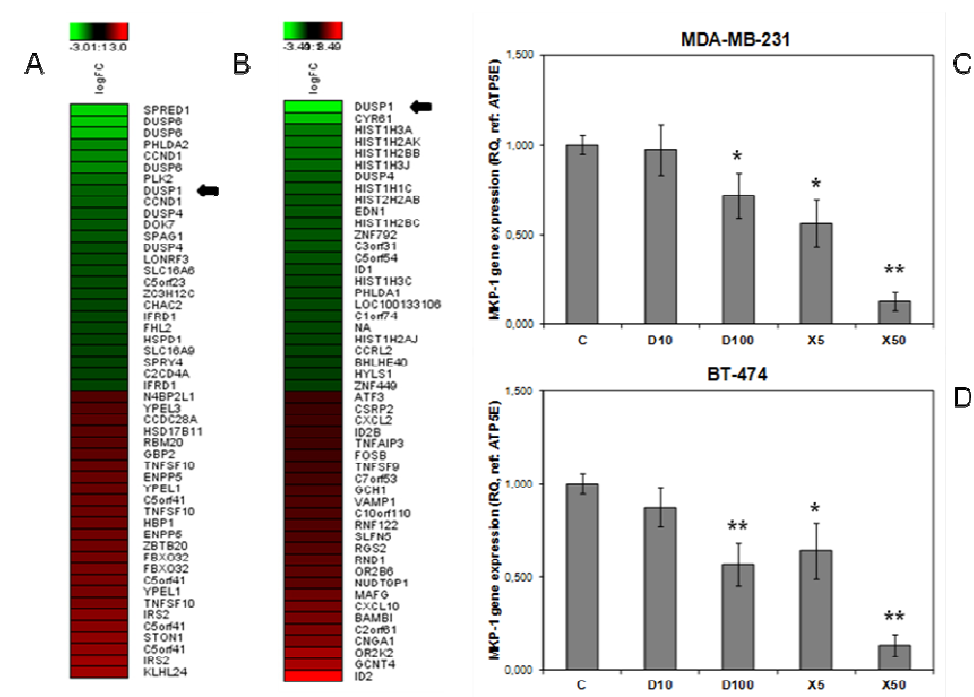


Figure 2.

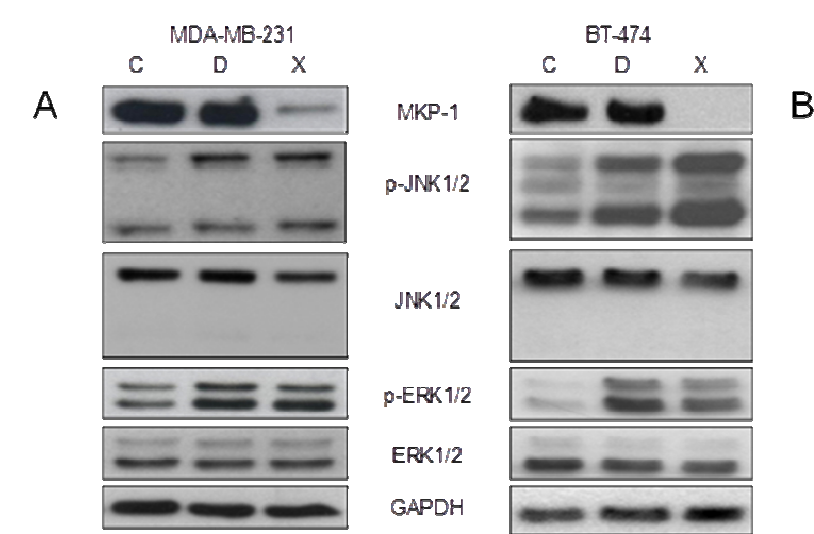


Figure 3.

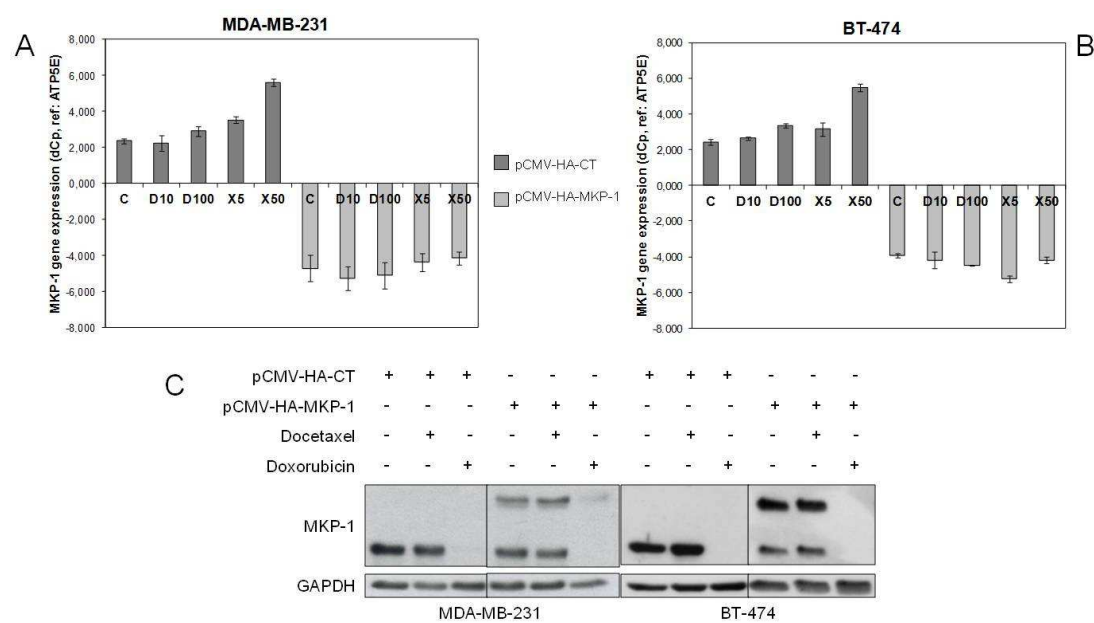


Figure 4.

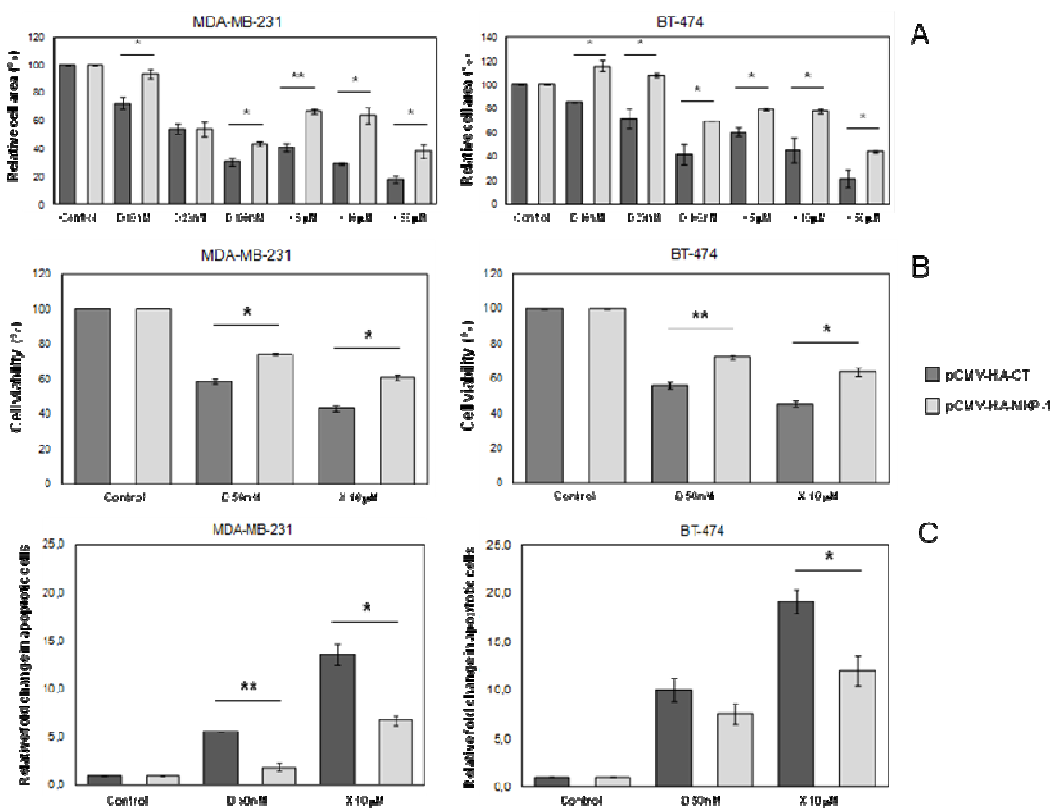


Figure 5.

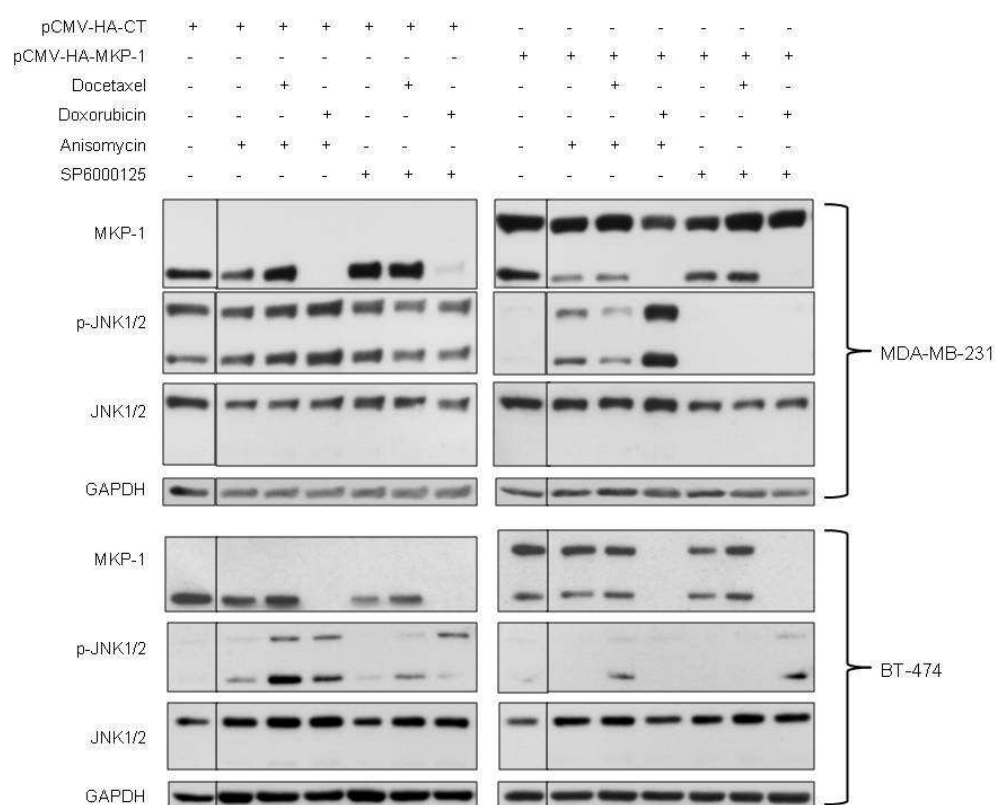


Figure 6.

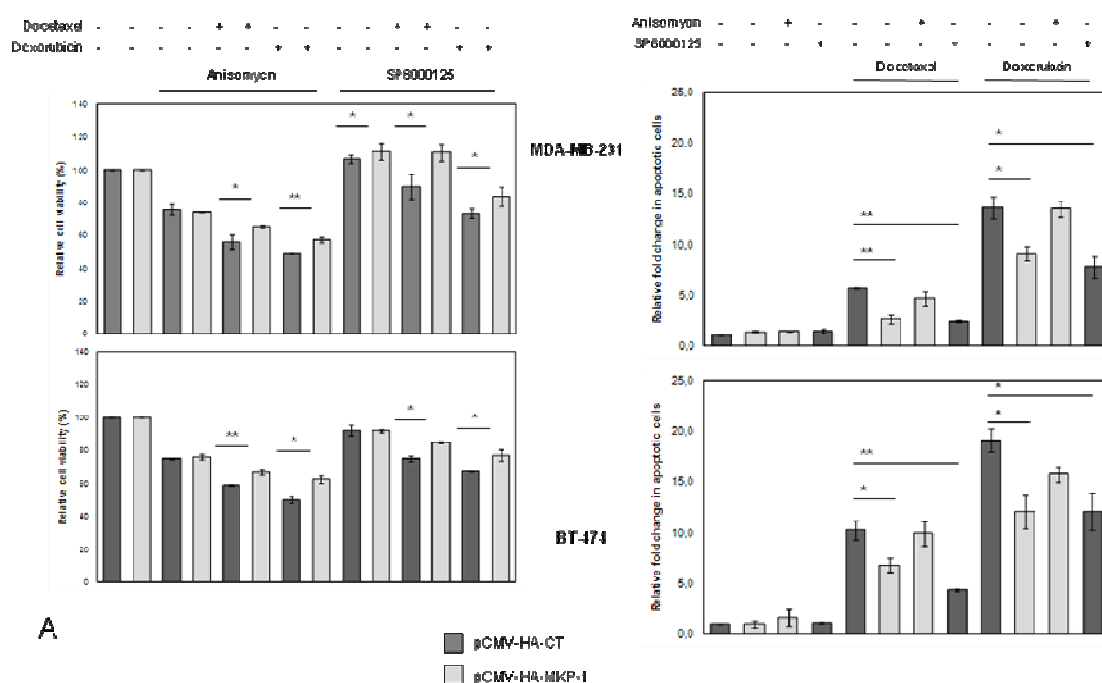


Figure 7.

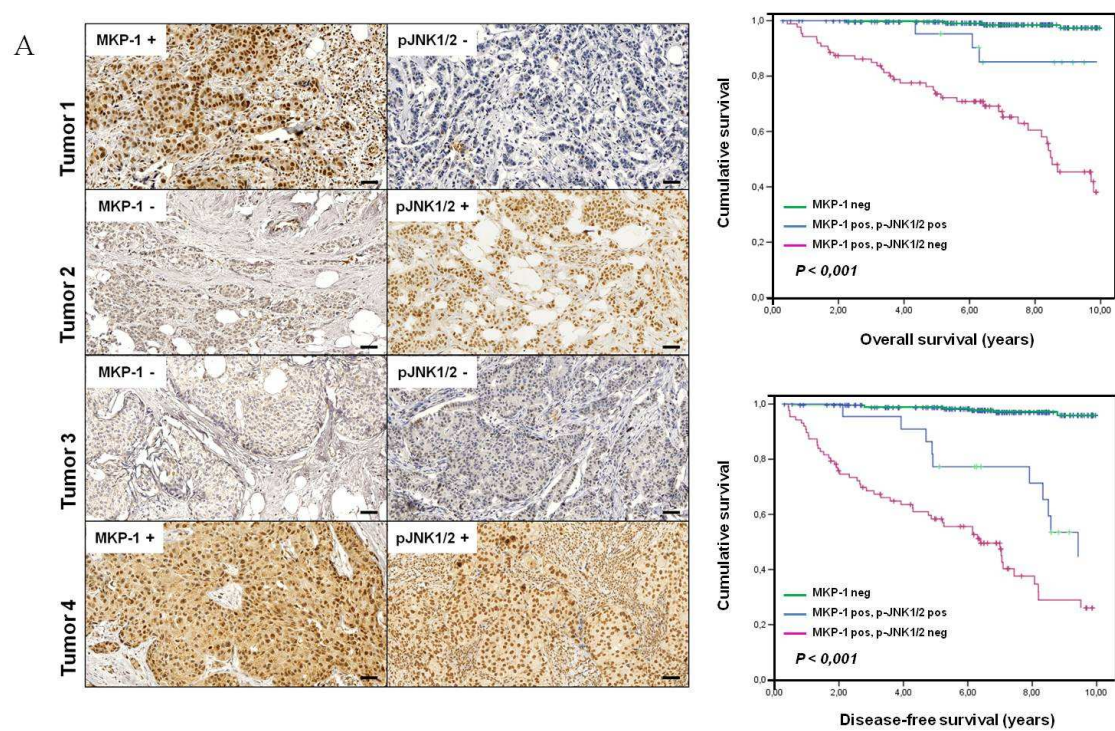


Table 1. Association of MKP-1 and p-JNK expression with molecular and clinical parameters in 350 BC patients.

	No. Cases	No. MKP-1 - (%)	No. MKP-1 + / pJNK + (%)	No. MKP-1 + / pJNK - (%)	p
MKP-1/p-JNK expression	350	241 (68.9)	22 (6.3)	87 (24.9)	
T	350	241	22	87	0.013
1	189	143 (59.3)	9 (40.9)	37 (42.5)	
2	126	81 (33.6)	10 (45.5)	35 (40.2)	
3	33	17 (7.1)	3 (13.6)	13 (14.9)	
4	2	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.3)	
N	350	241	22	87	0.147
0	203	149 (61.8)	10 (45.5)	44 (50.6)	
1	87	57 (23.7)	8 (36.4)	22 (25.3)	
2	38	25 (10.4)	2 (9.1)	11 (12.6)	
3	22	10 (4.1)	2 (9.1)	10 (11.5)	
Grade	350	241	22	87	0.880
1	52	35 (14.5)	2 (9.1)	15 (17.2)	
2	163	111 (46.1)	11 (50.0)	41 (47.1)	
3	135	95 (39.4)	9 (40.9)	31 (35.6)	
ER	350	241	22	87	0.911
Negative	101	68 (28.2)	7 (31.8)	26 (29.9)	
Positive	249	173 (71.8)	15 (68.2)	61 (70.1)	
PR	350	241	22	87	0.767
Negative	134	92 (38.2)	7 (31.8)	35 (40.2)	
Positive	216	149 (61.8)	15 (68.2)	52 (59.8)	
HER2	350	241	22	87	0.919
Negative	271	188 (78.0)	17 (77.3)	66 (75.9)	
Positive	79	53 (22.0)	5 (22.7)	21 (24.1)	
StGallen molecular subtype	350	241	22	87	0.400
Luminal A	162	119 (49.4)	6 (27.3)	37 (42.5)	
Luminal B HER2-	42	25 (10.4)	6 (27.3)	11 (12.6)	
Luminal B HER2+	53	35 (14.5)	4 (18.2)	14 (16.1)	
HER2	26	18 (7.4)	1 (4.5)	7 (8.0)	
Triple negative	67	44 (18.3)	5 (22.7)	18 (20.7)	
Relapse	350	241	22	87	<0.001
No	277	234 (97.1)	9 (40.9)	34 (39.1)	
Yes	73	7 (2.9)	13 (59.1)	53 (60.9)	
Ki-67	350	241	22	87	0.140
Low	241	169 (70.1)	11 (50.0)	61 (70.1)	
High	109	72 (29.9)	11 (50.0)	26 (29.9)	

ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor.

Table 2. Univariate and multivariate Cox analyses in the cohort of 350 breast cancer patients (overall survival analysis).

	Univariate OS analysis				Multivariate OS analysis			
	HR	95% CI		Significance	HR	95% CI		Significance
T				<0.001				0.104
I	1.000				1.000			
II	2.729	1.505	a 4.946		1.474	0.711	a 3.054	
III	3.672	1.636	a 8.246		1.457	0.494	a 4.299	
IV	13.557	3.966	a 46.341		9.308	1.546	a 56.036	
N				<0.001				0.013
0	1.000				1.000			
1	1.639	0.854	a 3.143		0.958	0.443	a 2.071	
2	2.236	1.023	a 4.887		0.499	0.147	a 1.692	
3	6.961	3.537	a 13.700		2.926	1.251	a 6.844	
Grade				0.045				0.796
1	1.000				1.000			
2	1.368	0.559	a 3.347		1.464	0.480	a 4.466	
3	2.377	0.989	a 5.717		1.426	0.450	a 4.521	
ER				0.006				0.014
Negative	1.000				1.000			
Positive	0.477	0.285	a 0.797		0.430	0.219	a 0.845	
HER2				0.173				
Negative	1.000							
Positive	1.510	0.851	a 2.678					
Ki-67				0.832				
Low	1.000							
High	0.937	0.515	a 1.707					
Chemotherapy				0.580				
None	1.000							
Adjuvant	0.728	0.362	a 1.463					
Neoadjuvant	0.962	0.373	a 2.481					
Hormone therapy				0.342				
No	1.000							
Yes	0.754	0.425	a 1.338					
MKP-1 and p-JNK1/2				<0.001				<0.001
MKP-1 neg	1.000				1.000			
MKP-1 pos, p-JNK1/2 pos	4.923	1.172	a 20.674		4.518	1.070	a 19.081	
MKP-1 pos, p-JNK1/2 neg	29.314	11.523	a 74.575		26.086	10.103	a 67.353	

Table 3. MKP-1 and p-JNK 1/2 in locally advanced breast cancer patients who received neoadjuvant taxane-based chemotherapy.

	MKP-1 neg	MKP-1 pos, p-JNK1/2 pos	MKP-1 pos, p-JNK1/2 neg
Pre-chemotherapy specimens (n=64)	(n=36)	(n=13)	(n=15)
Pathological complete response	15	3	0
No pathological complete response	21	10	15
Overall response rate	41.6%	23.1%	0%
P-value		0,008	

